



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

TESE

MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA
‘DANCY’: ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS, VARIABILIDADE
GENÉTICA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

ANDRÉA CELINA FERREIRA DEMARTELAERE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA
‘DANCY’: ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS,
VARIABILIDADE GENÉTICA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

ANDRÉA CELINA FERREIRA DEMARTELAERE

Sob a Orientação da Professora
Luciana Cordeiro do Nascimento

e Co-orientação da Professora
Élida Barbosa Corrêa

Tese submetida como requisito para
obtenção grau de **Doutor em Agronomia**,
no Programa de Pós-Graduação em
Agronomia.

Areia-PB
Dezembro de 2015

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

D372m Demartelaere, Andréa Celina Ferreira.

3.2.1 Mancha marrom de alternaria em tangerina ‘dancy’: aspectos morfofisiológicos, variabilidade genética e indução de resistência / Andréa Celina Ferreira Demartelaere. - Areia: UFPB/CCA, 2015.
136f. : il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2015.

Bibliografia.

Orientadora: Luciana Cordeiro do Nascimento.

1. Mancha marrom – Tangerina Dancy 2. *Alternaria alternata* – Manejo integrado de pragas 3. *Citrus tangerina* – Doenças I. Nascimento, Luciana Cordeiro do (Orientadora) II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM
TANGERINEIRA ‘DANCY’: ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS,
VARIABILIDADE GENÉTICA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA**

AUTOR: ANDRÉA CELINA FERREIRA DEMARTELAERE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AGRONOMIA
(Agricultura Tropical) pela comissão Examinadora:

Prof^ª Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento
UFPB/PPGA
(Orientadora)

Prof^ª Dra. Nivânia Pereira da Costa
UFPB/CCHSA

Prof^ª Dra. Élide Barbosa Corrêa
UEPB

Prof^ª Dra. Rejane Maria Nunes Mendonça
UFPB/PPGA

Data da realização: 04 de dezembro de 2015.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra Luciana Cordeiro do Nascimento
Orientadora

“...Todas as vezes que se comprometerem a fazer algo na vida, procurem fazer do melhor modo, com honestidade, sinceridade e acima de tudo, com bom senso e sensibilidade. ... não se curvem às críticas insensatas, descomedidas de pessoas que nem sempre têm consciência do seu momento. Façam de suas vidas uma eterna conquista, rumo ao conhecimento, à grandeza de ser, à autenticidade e serão sempre vencedores...”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo presente da vida e por todas as oportunidades que me proporcionou e me proporciona até hoje nessa longa caminhada da vida;

A minha mãe Maria Suelly Ferreira de Souza pelo exemplo de amor, dedicação, perseverança, fé e incentivo, você é meu porto seguro, sem você jamais teria chegado até aqui. Te amo!!!!

Ao meu pai *in memoriam* Andreas Alphons Marie Demartelaere que foi um homem trabalhador, competente, de muita garra, inteligente, dedicado, honesto e acima de tudo foi o único homem que me mostrou o amor puro, verdadeiro e sincero. Te amarei para sempre!!!

A minha irmã Adrielly Suellen Ferreira Demartelaere por ter convivido com a distância, mas sempre torcendo pelo meu sucesso;

A Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo;

A minha orientadora Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento, quero agradecer por tudo aquilo que você fez e faz por mim, por tudo o que me ensinou dentro e fora de sala aula e, também, por tudo de bom que a senhora me proporcionou com sua postura séria, honesta, pela orientação, por cada momento de compreensão, luta, paciência, inteligência e dedicação, pelas oportunidades as quais me concedeu e acima de tudo pela amizade e carinho. Diante disso carregarei na bagagem coisas boas que servirão para toda a minha vida. Te adoro!!

A co-orientadora Profa. Élide Barbosa Correa pela amizade, apoio, incentivo e ajuda;

Aos professores que fazem parte do PPGA;

Aos funcionários do PPGA em especial a Eliane Araújo e Adriana Hermínio;

Aos funcionários do Laboratório Entomologia o Sr. Severino da Silva (Nino) e os de Fitopatologia (UFPB), Sr. José Tomás de Aquino eu te adoro muito e vou guardar seu carinho pelo resto de minha vida, porque sei que é sincero e de coração e a Dona Francisca pelos ensinamentos durante essa minha caminhada;

A minha amiga Selma Feitosa, agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho, eu jamais esquecerei todos os momentos que passamos juntas, você foi uma das melhores coisas que aconteceu na minha vida. Quero você sempre perto de mim! Não sei mais viver sem você. Te amooo amiga!

Aos amigos das disciplinas cursadas: Alex Barbosa (Aldasi), Carla Souza, Paula Frassinete, Dinara Silva, Aparecida Oliveira;

Ao pessoal do Laboratório de Química e do Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), do CCA/UFPB;

Aos amigos que fizeram presentes nesses três de convivência no LAFIT: Wilza Souza, Edcarlos Camilo, Hilderlande Camilo, Crystianne Vitória, Andrezza Araújo, Jean Sousa, Rhayssa Vieira, Leonardo Dantas, Rommel dos Santos e Wendel Maciel;

Aos amigos para todas as horas Kedma Maria e George Ferreira, saiba que adorei conviver com vocês esses anos. Adoro muito os dois!!

Ao colega de trabalho Breno Sousa pela ajuda e aprendizagem na área da biologia da molecular;

Gostaria de agradecer a toda minha equipe de trabalho que me acompanhou durante esses anos e teve comprometimento, dedicação, respeito, confiança, responsabilidade na execução dos experimentos e fizeram parte da minha vida em vários momentos tão importantes, como Cristina Marinho, Túlio Alves, Patrícia Abraão, Mirelly Porcino, Larissa Almeida, Caroline Vargas, Marciano Nunes, Hiago Antônio e Edvaldo Prazeres e também por terem dividido comigo as angústias, sofrimentos, as risadas, as brincadeiras, as horas extras em feriados e fins de semana e também algumas madrugadas. Saibam que a ajuda de vocês foi fundamental nessa minha caminhada e jamais conseguiria obter esse título e essa conquista sem a contribuição de vocês.

E à todos os demais colegas da área de Agronomia, que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

DEMARTELAERE, A.C.F. **Mancha Marrom de Alternaria em Tangerineira ‘Dancy’:** Aspectos Morfofisiológicos, Variabilidade Genética e Indução de Resistência. Areia: CCA/UFPB, 136f. 2015. (Tese de Doutorado em Agronomia).

RESUMO

A diversidade genética do fungo *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri* está associada aos fatores genéticos e ambientais e tem-se verificado influência na reprodução deste patógeno, responsável por causar sérios problemas econômicos em frutos e em mudas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka) no Estado da Paraíba. Entretanto, para o controle da mancha marrom de alternaria (MMA) são empregadas táticas dentro do manejo integrado utilizando produtos alternativos como o extrato etanólico de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* (Benth.)) Ducke, Quitosana® e o antagonista *Trichoderma asperellum*. Foram realizados três experimentos sendo que o primeiro no LAFIT e LAPOA, onde foi feito o teste *in vitro*, submetendo-se trinta isolados aos meios V8 ágar, extrato de folha ágar (EF), aveia dextrose ágar (ADA), batata dextrose ágar (BDA), nas temperaturas de 15, 25 e 35 °C e regimes de luz, escuro e luz contínua e luz alternada, incubados em B.O.D. O crescimento micelial (CM) foi avaliado em intervalos de 24 horas até sete dias e a esporulação foi quantificada em câmara de Newbauer e ajustada a 10⁵ esporos/mL. Em seguida, foi feita a caracterização molecular com 38 isolados por meio de marcadores ISSR e a similaridade genética quantificada pelo índice de Jaccard. O delineamento experimental utilizado na caracterização morfofisiológica foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial, 30 isolados, quatro meios de cultura: AV, BDA, EF e V8, três regimes de luz: claro contínuo, luz alternada e luz contínua e três temperaturas: 15, 25 e 35 °C com 12 repetições, constituindo um total de 12.960 placas de Petri, considerando uma placa de Petri por repetição. A análise de variância dos isolados foi realizada através do teste F ($p \leq 0,05$). As médias gerais foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) e as demais pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares SISVAR® 5.3 e SAS/STAT® 9.3. A diversidade genética nos trinta e oito isolados avaliados foi determinada com base na presença e ausência de fragmentos de DNA amplificados por três *primers* e visualizados em géis de eletroforese. As imagens foram processadas no software BioNumerics® para análise de similaridade genética de Jaccard. O dendrograma foi obtido pelas médias aritméticas dos grupos de isolados formados em pares de dados combinados (UPGMA). Independente do local de coleta e da condição de cultivo utilizada, todos os isolados apresentaram diferença estatística em relação ao crescimento

micelial e esporulação. Os isolados de *A. alternata* patótipo tangerina coletados de Massaranduba-PB apresentaram alto crescimento micelial, esporulação e alta diversidade genética em relação aos demais isolados avaliados. De forma geral, o regime de luz contínuo, a 25 °C nos meios BDA e V8 foram os ideais para o crescimento micelial e esporulação dos isolados avaliados *A. alternata* patótipo tangerina, no entanto, escuro contínuo em meio AV foi melhor aos isolados de Pratânia-SP até o sétimo dia de avaliação. Todos os isolados apresentaram alta diversidade genética entre eles e ocorreu uma tendência de agrupamento por local demonstrada pelos marcadores morfofisiológicos e moleculares avaliados. O segundo experimento, foi realizado no LAFIT e LAPOA, onde frutos de tangerina ‘Dancy’ foram desinfestados e imersos em extrato de *C. ferrea* nas concentrações 0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL, Quitosana® a 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L e *T. asperellum* a 10¹⁰ esporos/mL. Após 24 h da aplicação dos tratamentos, foi inoculado *A. alternata* (10⁵ esporos/mL) nos frutos. No segundo dia após a inoculação (DAI), foram realizadas diariamente as avaliações da severidade em frutos de tangerineira ‘Dancy’ até atingir a última escala de notas que se deu no décimo segundo dia e também verificou-se as atividades enzimáticas de fenil alanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase e a pós-colheita em frutos de tangerineira ‘Dancy’. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos (0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*), (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L da Quitosana®), (10¹⁰ esporos/mL de *T. asperellum*) e cinco repetições de cinco frutos, constituindo uma unidade experimental com 250 frutos de tangerineira ‘Dancy’. As concentrações 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea*, 1,5 g/L de Quitosana® e *T. asperellum* reduziram a severidade da MMA, promoveram alta atividade das enzimas fenil alanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase e em todos os tratamentos mantiveram a qualidade pós-colheita em frutos de tangerineira ‘Dancy’. O terceiro experimento, foi realizado no LAFIT e LAPOA, onde as mudas com 90 dias após a enxertia foram pulverizadas com extrato de *C. ferrea* nas concentrações de 0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL, acondicionadas em câmara úmida e mantidas em temperatura ambiente (28 ± 2 °C). Após 24 horas da pulverização com o extrato, foi realizada a inoculação de *A. alternata* (10⁵ esporos/mL) e após as 96 horas da inoculação até o vigésimo terceiro dia, foram feitas as avaliações de incidência, severidade, AACPD. Para as análises das atividades enzimática, foram retiradas três folhas/repetição no primeiro e no último dia do experimento. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*) e 25 repetições, formando a unidade experimental com 125 mudas. Nos dois últimos experimentos, foram realizados análises de regressão para as concentrações dos produtos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias

comparadas pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$) no programa SAS[®] System 9.3. Verificou-se que as concentrações 100 e 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea* reduziram a incidência de *A. alternata* e a severidade da MMA, apresentaram baixa atividade da enzima fenil alanina amônia-liase, porém, promoveram altas atividades da peroxidase e polifenoloxidase em folhas de tangerineira ‘Dancy’.

Palavras-chave: *Alternaria alternata*, *Citrus tangerina*, Extração de DNA,

DEMARTELAERE, A.C.F. **Stain Brown Alternaria in Tangerine 'Dancy': Morphophysiological Aspects, Genetic Variability and Resistance Induction.** Areia: CCA/UFPB, 136f. 2015. (Doctoral thesis in Agronomy)

ABSTRACT

The genetic diversity of the fungus *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri* is associated with genetic and environmental factors and there has been influence on reproduction of the pathogen responsible for causing serious economic problems in fruit and tangerine seedlings 'Dancy' (*Citrus tangerine* hort. ex Tanaka) in the state of Paraíba. However, for the control of Alternaria brown spot (MMA) tactics are employed with in the integrated management using alternative products such as ethanol extract ironwood (*Caesalpinia ferrea* (Benth.)) Ducke, Chitosan[®] and the antagonist *Trichoderma asperellum*. Three experiments were conducted and the first was the *in vitro* test, submitting thirty isolates the V8 agar, leaf extract (EF), dextrose agar oats (ADA), potato dextrose agar (PDA) in temperature 15, 25 and 35 °C and light regimes, dark and continuous light and alternating light, incubated in BOD The mycelial growth (CM) was evaluated at 24 hour intervals up to seven days and sporulation was quantified in a Neubauer chamber and adjusted to 10⁵ spores/mL. Then, the molecular characterization was done with 38 isolated by ISSR and genetic similarity quantified by Jaccard index. The experimental design used in Morphophysiological characterization was completely randomized in a factorial arrangement, 30 isolates, four culture media: AV, BDA, EF and V8, three light regimes: continuous light, alternating light and continuous light and three temperatures: 15, 25 and 35 °C with 12 reps, making a total of 12.960 Petri dishes considering a Petri dish by repetition. The variance analysis of isolates was performed using the F test ($p \leq 0,05$). The overall averages were compared by the Scott-Knott test ($p \leq 0,05$) and the other by the Tukey test ($p \leq 0,05$). Statistical analyzes were performed using the software SISVAR[®] 5.3 and SAS/STAT[®] 9.3. The genetic diversity in this thirty eight isolates was determined based on the presence or absence of amplified DNA fragments of three primers and viewed on electrophoresis gels. The images were processed in BioNumerics[®] software for analysis of genetic similarity Jaccard. The dendrogram was obtained by the arithmetic average of the individual groups formed in data matched pairs (UPGMA). Independent of the collection site and growing conditions used, all isolates showed statistical differences in relation to mycelial growth and sporulation. The isolates of *A. alternata* pathotype tangerine collected from Massaranduba-PB showed high mycelial growth, sporulation and high genetic diversity

compared to other tested isolates. In general, the continuous light regime at 25 °C on PDA and V8 media was ideal for the mycelial growth and sporulation of the isolated *A. alternata* this pathotype tangerine, however, continuous darkness among the best AV was isolated from Pratânia-SP until the seventh valuation day. All isolates showed high genetic diversity among them and there was a grouping of tendency by location shown by markers morphophysiological and molecular aspects evaluated. The second experiment was conducted in LAFIT and LAPOA, mandarin fruit 'Dancy' were disinfected and immersed in *C. ferrea* extract at concentrations of 0; 10; 100; 500 and 1000 µg/mL, 0,5 Chitosan[®]; 1,0; 1,5 to 2,0 g/L. and *T. asperellum* to 10¹⁰ spores/mL. After 24 h the application of with the extracts was inoculated *A. alternata* (10⁵ spores/mL) in fruits. On the second day after inoculation (DAI) were performed daily the severity assessments in fruits of tangerine 'Dancy' until the last grading scale that occurred on the twelfth day and also. For the analysis of enzyme activities of phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol and post-harvest fruit tangerine 'Dancy'. The design was completely randomized with 10 treatments (0; 10; 100; 500 and 1000 µg/mL of *C. ferrea* extract), (0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 g/L of Chitosan[®]) (10¹⁰ spores/mL *T. asperellum*) and five replicates of five fruits, constituting an experimental unit with 250 fruit tangerine 'Dancy'. The concentrations of 500 µg/mL *C. ferrea* extract, 1,5 g/L Chitosan[®] and *T. asperellum* reduced the severity of MMA promoted high activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase and all treatments kept the postharvest quality in fruits of tangerine 'Dancy'. The third experiment was conducted in LAFIT and LAPOA, the plants 90 days after grafting were sprayed with *C. ferrea* extract at concentrations of 0; 10; 100; 500 and 1000 µg/mL, placed in a humid chamber and maintained at room temperature (28 ± 2 °C). After 24 hours of spraying was carried out the inoculation of *A. alternata* (10⁵ spores/mL) and after 96 hours of inoculation until the twenty third day, the incidence were made reviews, severity AUDPC and analysis of enzymatic activities. For the determination of phenylalanine ammonia-lyase activity, peroxidase and polyphenol, were taken three sheets/repeat in the first and last day after treatment application of the products. The design was completely randomized with five treatments (0; 10; 100; 500 and 1000 µg/mL of *C. ferrea* extract) and 25 repetitions, forming the experimental unit with 125 seedlings. In the last two experiments, regression analyzes were performed for the concentrations of *C. ferrea* extract the data were submitted to analysis of variance and the means compared by Dunnett test ($P \leq 0,05$) in SAS[®] System 9.3 program. It was found that the concentrations of 100 and 500 µg/mL *C. ferrea* extract reduced the incidence and severity *A. alternata* MMA, showed low activity of the enzyme phenylalanine ammonia-

lyase, however, promoted high peroxidase activity and polyphenol oxidase in leaves of tangerine 'Dancy'.

Key words: *Alternaria Alternata*, *Citrus tangerine*, DNA extraction

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

- | | |
|----------|---|
| Tabela 1 | Isolados de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina utilizadas no estudo. UFPB, Areia-PB, 2015. |
| Tabela 2 | <i>Primers</i> ISSR utilizados na caraterização molecular de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina. UFPB, Areia-PB, 2015. |
| Tabela 3 | Crescimento Micelial (CM) de isolados de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina. UFPB, Areia-PB, 2015. |
| Tabela 4 | Crescimento Micelial (CM) de isolados de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina em função de diferentes condições de cultivo. UFPB, Areia-PB, 2015. |
| Tabela 5 | Esporulação de isolados de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina. UFPB, Areia-PB, 2015. |
| Tabela 6 | Esporulação de isolados de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina em diferentes condições de cultivo. UFPB, Areia-PB, 2015. |

CAPITULO I

LISTA DE FIGURAS

Figura 1

Dendrograma com trinta e oito isolados de *A. alternata* patótipo tangerina coletados em diferentes localidades, agrupados de acordo com estimativas de similaridade genética obtidas pelas bandas polimórficas geradas pelo método ISSR (UPGMA). UFPB, Areia-PB, 2015.

CAPÍTULO II

Figura 1

Escala diagramática descrita por Renaud et al. (2004) para avaliação da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*). UFPB, Areia-PB, 2015.

Figuras 2

Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações: (A) 0; (B) 10; (C) 100; (D) 500 e (E) 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação à testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Figuras 3

Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações: (A) 0; (B) 0,5; (C) 1,0; (D) 1,5 e (E) 2,0 g/L de Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Figura 4

Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL), utilizando *Trichoderma asperellum* (10^{10} esporos/mL) e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Figuras 5A e B

Atividade da fenilalanina amônia-liase em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculadas com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Figura 6

Atividade da enzima Peroxidase em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria*

alternata f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

- Figura 7 Avaliação da acidez em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).
- Figura 8 Potencial hidrogeniônico em frutos de tangerina ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações da Quitosana® e a testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).
- Figura 9 Relação sólidos solúveis totais/acidez titulável em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações de Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).
- Figuras 10A e B Ácido ascórbico em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea*, Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

CAPÍTULO III

- Figura 1 Escala diagramática descrita por Martelli (2011) para avaliação da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*). UFPB, Areia-PB, 2015.
- Figura 2 Incidência em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculadas com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).
- Figura 3 Escala diagramática da severidade em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculadas com

Alternaria alternata f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL), em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Figuras 4 Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações: (A) 0; (B) 10; (C) 100; (D) 500 e (E) 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Figura 5 Atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculadas com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	08
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO GERAL.....	20
INTRODUÇÃO.....	20
OBJETIVO GERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
1. Aspectos Gerais da Citricultura.....	22
1.1 Tangerineira ‘Dancy’.....	24
2. Mancha Marrom de <i>Alternaria</i>	25
3. O Fitopatógeno <i>Alternaria alternata</i> Patótipo Tangerina.....	26
4. Marcadores Moleculares.....	29
5. Métodos Alternativos no Controle da Mancha Marrom de <i>Alternaria</i>	29
5.1 Biológico.....	30
5.2 Pau-ferro.....	31
5.3 Quitosana®.....	31
6. Indução de Resistência.....	32
7. Desenvolvimento e Fisiologia da Maturação do Fruto e a Importância da Preservação das Características Pós-colheita.....	35
REFERÊNCIAS.....	37

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Alternaria alternata* PATÓTIPO TANGERINA.....

	47
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	49
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS.....	71

CAPÍTULO II

ALTERNATIVAS NO CONTROLE DA MANCHA MARROM DE *ALTERNARIA* EM TANGERINEIRA ‘DANCY’ (*Citrus tangerina*).....

	76
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	78
INTRODUÇÃO.....	79
MATERIAL E MÉTODOS.....	81
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS.....	104

CAPÍTULO III

MANEJO DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA ‘DANCY’ COM EXTRATO DE <i>Caesalpinia ferrea</i>.....	113
RESUMO.....	113
ABSTRACT.....	115
INTRODUÇÃO.....	116
MATERIAL E MÉTODOS.....	118
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS.....	131

MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA 'DANCY': ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS, VARIABILIDADE GENÉTICA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Andréa Celina Ferreira Demartelaere¹; Luciana Cordeiro do Nascimento¹;

¹Laboratório de Fitopatologia, PPGA/CCA/UFPB;

Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Rodovia PB 079, Km 12 CEP 58397-000, Areia - PB, e-mails:

andrea_celina@hotmail.com, lucianacordeiro@cca.ufpb.br

INTRODUÇÃO

As tangerineiras destacam-se na fruticultura mundial e constitui o segundo grupo de frutas mais importante e competitiva na citricultura brasileira, com uma expressiva atividade econômica, sendo bastante apreciável pelo mercado consumidor por apresentar elevados teores de ácidos orgânicos, proteínas, lipídeos, vitaminas e compostos fenólicos, além da facilidade de industrialização, relativa resistência e ampla adaptação das plantas as diferentes condições de clima e de solo (CITRICULTURA, 2013).

Apesar da importância sócio-econômica para a região Nordeste, verifica-se baixa produtividade em decorrência de doenças, destacando-se as causadas por fungos: gomose (*Pythophthora nicotianae*) Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur), verrugose (*Elsinoe fawcetti*) (Bitanc. & Jenkins), mancha-preta dos citros (MPC) (*Guignardia citricarpa Phyllosticta citricarpa* (McAlp. Van der Aa) e a mancha marrom de alternaria (MMA) (*Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri*) os quais revelam o principal entrave à continuidade da atividade citrícola para algumas espécies (ROSSETI, 2014).

A. alternata é considerado um patógeno de crescimento micelial lento e baixa esporulação em meios de cultura convencionais, dificultando a produção do inóculo em grande escala (SILVA; TEIXEIRA, 2012). Entretanto, pesquisa realizada por Silva; Melo (1999), verificaram que, cada microrganismo, requer necessidades mínimas de nutrição necessária ao crescimento e esporulação, verificada notadamente quanto às concentrações de C, P e N, os tipos de fontes de vitaminas e micronutrientes, tornando fatores decisivos para o sucesso no crescimento das estruturas fúngicas em meios de cultura.

Estudos sobre a fisiologia de fitopatógenos e a diversidade genética são extremamente importantes para a busca de informações que elucidem os mecanismos de ação desse fungo, a

relação patógeno-hospedeiro, bem como, a variabilidade das populações, fatores responsáveis por determinar o potencial de adaptação do organismo às diferentes condições ambientais, bem como a agressividade dos isolados, o que pode implicar nos programas de melhoramento e nas estratégias no controle de doenças (GARCIA, 2013).

Considerando-se estratégias promissoras no controle de doenças, com menos impacto ambiental através da redução do uso de agrotóxicos, os avanços na agricultura agroecológica, visa a proteção de plantas através da indução de resistência, que ocorre por meio da ativação de genes que codificam diversas respostas da defesa vegetal, ativando os mecanismos através de agentes externos (indutores) bióticos ou abióticos (STANGARLIN et al., 2011), podendo aumentar a produção e contribuir para atender à crescente demanda nacional e internacional e com produtos de alta qualidade.

Entretanto, o uso de produtos alternativos como as caldas, extratos vegetais, biofertilizantes e polímeros absorventes são de extrema importância dentro das práticas de manejo integrado no controle de doenças. Essa crescente demanda mundial por insumos menos tóxicos, reforça e justifica a busca por produtos alternativos, visando o controle de doenças de plantas na agricultura. Dentre estes, os indutores de resistência, vêm se destacando por apresentarem eficiência no controle de doenças em várias culturas e por serem praticamente atóxicos e não deixarem resíduos danosos à saúde humana e ao meio ambiente (GIONGO; MENDES; SANTOS, 2015).

O uso de extratos vegetais de plantas, como exemplo o pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* (Benth)) Ducke, tem se mostrado viável ao considerar que os compostos secundários presentes na estrutura química dos mesmos, podem ter efeito inibitório sobre a ação de diversos patógenos, tornando um método eficiente, por ativar os mecanismos de defesa em frutos e em plantas (RICE, 1984).

A utilização da Quitosana® também se destaca como uma alternativa no manejo de doenças de plantas, por ser um polímero extraído do exoesqueleto de crustáceos, responsável pelo engrossamento da parede celular dos tecidos dos hospedeiros e formação de papilas que ocupam espaço intracelular com material fibrilar parcialmente impregnado com substâncias amórficas, que são compostos antifúngicos semelhantes aos fenóis e que induzem respostas de defesa (RODRIGUEZ et al., 2015).

No controle biológico de doenças, o antagonista *Trichoderma* spp. tem sido bastante eficiente impedindo a colonização de patógenos nos frutos, além da produção de metabólitos tóxicos liberado pela ação do antagonista, que pode provocar alterações morfológicas e bioquímicas no vegetal, induzindo respostas de defesa (FREITAS, 2014).

OBJETIVO GERAL

- ✓ Determinar a influência de diversos fatores relacionados ao cultivo *in vitro* sobre a fisiologia e a diversidade de isolados de *A. alternata*, bem como, alternativas no controle da mancha marrom de alternaria em frutos e em mudas de tangerineira ‘Dancy’.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar as condições ideais para o crescimento micelial e esporulação de *A. alternata* em diferentes meios de cultura, temperaturas e regimes de luz;
- ✓ Determinar a diversidade genética de isolados de *A. alternata* provenientes de diversas regiões produtoras de tangerineira ‘Dancy’;
- ✓ Avaliar o potencial do extrato vegetal de *C. ferrea*, o polímero Quitosana® e o fungo *T. asperellum* como indutores em respostas de defesa em frutos de tangerineira ‘Dancy’ no manejo da mancha marrom de alternaria e manutenção da pós-colheita;
- ✓ Definir o potencial do extrato vegetal de *C. ferrea*, como indutor em respostas de defesa em mudas de tangerineira ‘Dancy’ no manejo da mancha marrom de alternaria.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Aspectos Gerais da Citricultura

De origem asiática, pertencente à família Rutaceae, Tribo Citreae e subtribo Citrinae (SWINGLE, 1967) os citros foram introduzidos no Brasil no período da colonização, provavelmente pela Bahia. E em seguida, houve uma rápida disseminação do cultivo para diversas regiões do país, graças às condições climáticas que permitiram que as plantas vegetassem de forma exuberante e obtivessem uma alta produtividade (MOREIRA, 1991).

O gênero *Citrus* apresenta grande importância econômica, podendo destacar as laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerina comum (*Citrus reticulata* Blanco), limas ácidas (*Citrus aurantifolia* Swing), limas doces (*Citrus limettoides* Tan.), limões (*Citrus limon* Burm F.), cidras (*Citrus medica* L.), tangerina ‘Sunki’ (*Citrus sunki* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka), tangerina ‘Cléopatra’ (*Citrus reshini* hort. ex Tanaka), laranjas azedas (*Citrus aurantium* L.), pomelos (*Citrus paradisi* Macf.), toranjas (*Citrus grandis* Osbeck) e outras espécies incluindo híbridos naturais (CHAPOT, 1975).

Entretanto, a citricultura destaca-se na fruticultura mundial com uma produção de citros (laranjas, tangerinas, limas ácidas/limões) em torno de R\$ 7,1 bilhões, o que faz o quinto maior representante do agronegócio brasileiro (IBGE, 2015). De acordo com os dados da FAO (2015), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de tangerineiras com uma produção de um milhão de toneladas (5,3% da produção mundial), ficando atrás da China (47,5% da produção mundial) e Espanha (8,0% da produção mundial).

O Estado de São Paulo é o principal pólo produtor de tangerineiras com 959.672 toneladas na safra de 2014 (IBGE, 2015). No Nordeste, a Paraíba encontra-se na oitava posição no ranking com 20 mil toneladas (IBGE, 2015), entretanto, percebe-se uma expansão no mercado citrícola nos últimos anos, o que tem contribuído para o crescimento socioeconômico, elevando a balança comercial nacional e gerando empregos (VIEIRA; VERISSIMO, 2009).

Os citros fazem parte da dieta dos brasileiros, pois, além de serem importante fonte de vitaminas e fibras, as frutas e sucos cítricos recentemente vêm sendo reconhecidos por conterem metabólitos secundários incluindo antioxidantes como ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonóides, limonoides que são importantes para a nutrição humana (DUZZIONI, 2010).

Por apresentar atividade antioxidante, a vitamina C é a primeira linha de anticorpos contra radicais derivados do oxigênio em meio aquoso. Essa vitamina reage diretamente com superóxidos, radicais hidroxilas e o oxigênio singlete. Tem grande importância fisiológica nos seres humanos devido a sua participação em diversas ocorrências no organismo, como

formação do tecido conjuntivo, produção de hormônios e anticorpos, biossíntese de aminoácidos e prevenção do escorbuto. E é considerado um antioxidante fisiológico versátil, pois pode exercer ação nos compartimentos intra e extracelulares (GONÇALVES, 2008).

Além da laranja ser um das frutas mais produzidas e com maior aceitação do mercado consumidor, pode-se destacar também as tangerineiras (OLIVEIRA; BRUNINI; NUNES, 2014) que por sua vez representam o segundo grupo de frutas cítricas de maior importância econômica para o país, podendo ser classificadas em tangerinas Comuns (*Citrus reticulata* Blanco) que é composta por: Pokan, Pokan IAC-224, Pokan Precoce IAC-595, Clementina e Fortune. As tangerinas Satsumas: (*Citrus unchiu* Marchovitch): Satsuma, S. Owari, S. Miyagawa IAC-537. As mexericas (*Citrus deliciosa* Tenore): Mexerica Mogi das Cruzes IAC-606 e Mexerica Tardia IAC-589. E a tangerina (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka): ‘Dancy’ (SILVA, 2014) que apresenta altos teores de vitaminas B1 e B2, compostos antioxidantes, que são indispensáveis na inativação dos radicais livres (PELISSARI, 2013). Além de conter grande quantidade de fibras, de sais minerais como magnésio, potássio, cálcio, fósforo e da substância betacaroteno (precursor da vitamina A) (HORTIFRUTI, 2016).

A citricultura representa um papel fundamental na produção tanto para o comércio nacional e internacional, porém, ao longo dos anos, vem surgindo diversos problemas fitossanitários, dentre eles, destacam-se as causadas por vírus como a leprose (*Citrus leprosis virus* (CiLV), tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*), por bactérias como cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Hasse), CVC (amarelinho) (*Xylella fastidiosa* Wells) e greening (etiologia desconhecida), nematóides parasitas *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni* e por fungos como gomose (*Phytophthora citrophthora*), pinta-preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), verrugose (*Elsinoe fawcetti*), mancha-preta dos citros (MPC) (*Guignardia citricarpa Phyllosticta citri-carpa* McAlp. Van der Aa) e a mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri*) que ataca patótipos de tangerina (CARVALHO et al., 2011). Este patógeno produz uma toxina hospedeiro-específica, denominada ACT, que consiste num fator de virulência para este patógeno, propiciando o aparecimento dos sintomas característicos em tangerinas e seus híbridos, dentre eles destaca-se a cultivar ‘Dancy’. Entretanto, esses fatores fitossanitários revelam o principal entrave à continuidade da atividade citrícola para algumas espécies (MAPA, 2015),

1.1 Tangerineira ‘Dancy’

A tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex. Tanaka) possui seu centro de origem na Flórida, cultivar que apresenta ciclo precoce variando de 8 a 10 meses (período que vai desde o florescimento até atingir a maturação) (GOMES, 2010). Possui características morfológicas

como arbustos de porte médio, copa arredondada e hábito de crescimento ereto. O caule tem tronco cilíndrico. As raízes são do tipo pivotante, atingindo 60 cm na vertical e até 2 m na horizontal. As folhas podem ser simples ou compostas, unifoliatas, com limbos inteiros. Sua forma é elíptica, oval ou lanceolada e, de aspecto coriáceo, persistentes e de coloração verde-claro quando novas e passam para o verde mais escuro à medida que envelhecem. Possuem poucos espinhos e com glândulas que produzem óleo essencial. Já as flores apresentam coloração branca de tamanho pequeno, com inflorescências solitárias ou agrupadas do tipo cacho ou sub-tipo corimbo, hermafroditas e com pedúnculo curto, liso e articulado (VIEIRA; VERISSIMO, 2009).

Os frutos são do tipo não-climatéricos, adequados para consumo *in natura*, são hesperidium, pois apresentam uma média de 6 a 20 sementes por fruto, possuem forma oblata, globulosas ou subglobulosas, com casca lisa, fina, de fácil aderência e com espessura em torno de 3,5 mm, diâmetro e altura do fruto medindo 6,3 cm e 4,7 cm respectivamente, peso médio em torno de 103,4 g. Possui epicarpo de coloração laranja-avermelhado, com aroma bem distintivo, polpa alaranjada e sabor bastante apreciável, com consideráveis fonte de vitamina C e rico em vitaminas B1 e B2, Mg, K, Ca, P, além de conter grande quantidade de fibras e betacaroteno (precursor da vitamina A) (PELISSARI, 2013).

Apesar de a tangerineira ‘Dancy’ apresentar diversos aspectos morfológicos, fisiológicos e organolépticos que favorecem a aceitação do mercado consumidor, é suscetível a *A. alternata*, responsável por causar a mancha marrom de alternaria (MMA) (IAC, 2016).

2. Mancha Marrom de Alternaria

O primeiro relato da mancha marrom de alternaria (MMA) ocorreu em tangerina Emperor na Austrália em 1903 (KIELY, 1964). Em 1974, observou-se a MMA na Flórida, infectando frutos e ramos de tangerineira ‘Dancy’ (WHITESIDE, 1976). Em 1989, foi relatada em Israel (SOLEL, 1991) e posteriormente encontrada na África do Sul (SCHUTTE et al., 1992), Cuba (HERRERA, 1992), Colômbia (CASTRO-CAICEDO; LEGUIZAMON; LOPEZ, 1994), Turquia (CANIHOS; ERKILIC; TIMMER, 1997), Espanha (VICENT et al., 2000), Itália (BELLA; GUARINO; CATARA, 2001), Argentina (PERES; AGOSTINI; TIMMER, 2003) e Peru (MARÍN et al., 2006).

No Brasil, o primeiro relato de MMA ocorreu em plantas de tangerineira ‘Dancy’ em pomares localizados no estado do Rio de Janeiro (GOES; MONTES de OCA; REIS, 2001). Nos anos subsequentes, sua presença foi identificada nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (SPÓSITO et al., 2003). Esta doença vem se constituindo em fator limitante

à produção de tangerinas, devido à sua alta suscetibilidade e condições ambientais favoráveis à ocorrência da doença (SOUZA, 2009).

O processo de infecção e colonização de *A. alternata* ocorre geralmente pela penetração do fungo através dos estômatos, onde se verificam hifas espessas dentro do tecido, com diâmetro maior que o tubo germinativo do conídio, apresentando micélio interno ramificado, colonizando e liberando toxinas nos tecidos que pode ser a ACT ou ACR, causando ação rápida e extravasamento celular, destruindo as células ao redor do ponto de penetração e assim garantindo nutrientes para sua sobrevivência, papel fundamental na expressão dos sintomas (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000; STUART et al., 2009).

A doença pode iniciar em ramos novos, formando lesões necróticas com uma forma arredondada ou alongada, medindo de 3-8 mm e coloração marrom-escura (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Nas folhas jovens, as lesões são necróticas com tamanhos variando de 3-6 mm de diâmetro e de 1-3 mm de profundidade. Em folhas maduras a MMA aparece como distintas manchas amarronzadas, circundadas por um halo amarelo de coloração marrom ou preta. Com o tempo, essas lesões aumentam de tamanho, formando grandes áreas da superfície da folha, dependendo da quantidade de inóculo, grau de suscetibilidade e idade dos órgãos vegetais, pode ocorrer a queda prematura de folhas, pétalas e em frutos jovens (REIS et al., 2006).

Os sintomas aparecem nos frutos com 24 a 48 horas após a infecção. A toxina produzida pelo fungo é responsável pelas áreas necrosadas dos tecidos atacados, sendo que o tamanho das lesões e a extensão da necrose podem variar, em função da suscetibilidade do tecido da variedade cítrica. Nos frutos, as lesões são de coloração marrom-escura, inicialmente deprimidas no centro, podendo apresentar exsudatos de consistência viscosa e são circundadas por um halo amarelado (FEITCHENBERG et al., 2005).

Em frutos completamente formados, inicialmente a mancha é corticosa, saliente e deprimida no centro, circundadas por um halo amarelado, formando pústulas. Onde as lesões mais desenvolvidas atingem grandes áreas da casca e atingindo a polpa, podendo também provocar cicatrizes que depreciam o fruto, comprometendo a produtividade e inviabilizando a comercialização para consumo *in natura* (FEICHTENBERGER et al., 2005).

3. O Fitopatógeno *Alternaria alternata* Patótipo Tangerina

Os fungos do gênero *Alternaria* são cosmopolitas, acometem vários hospedeiros vegetais e são considerados saprofíticos facultativos, sobretudo, são mais evoluídos quando envolvidos com patogenicidade (WALTON, 1996). Esses fungos, denominados anamorfos/imperfeitos em virtude da ausência da fase sexual, na maioria de suas espécies, são

morfológica e geneticamente similares, entretanto, apresentam diferenças patológicas e genéticas (KUSABA; TSUGE, 1994). Por esse fato, linhagens de certas espécies, principalmente *A. alternata*, têm sido referidas como *forma specialis* ou patótipos, em função do seu hospedeiro (KOHMOTO; OTANI, 1995).

A. alternata contém sete patótipos, que produzem toxinas que causam doenças em diferentes plantas, dentre elas: a toxina AF, que causa doenças em morangos, a toxina AK, que afeta pera, a toxina ACT, que afeta especificamente tangerinas, tangores e tangelos (HATTA et al., 2002) e a toxina ACR ou ACRL que afeta limões (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). De acordo com Walton (1996), a ACT é uma micotoxina formada pelo ácido tenuazônico que, em contato com a planta, atua na membrana plasmática, provocando a sua permeabilização e a morte celular.

A espécie *A. alternata* causa duas enfermidades distintas em plantas de citros, a saber: a MMA que tem *A. alternata* patótipo tangerina como agente etiológico; e a mancha foliar de alternaria (MFA), que é atribuída ao fungo *A. alternata* patótipo limão rugoso, a qual é caracterizada por afetar especificamente as folhas de limoeiros ‘Rugoso’ (*Citrus jambhiri* Lush.) e ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osb.) e por sintetizar a toxina hospedeiro-específica ACR (AKIMITSU; PEELVER; TIMMER, 2003; PEEVER; CARPENTER; TIMMER, 2004).

O agente etiológico da MMA foi inicialmente descrito como *Alternaria citri* Ellis & Pierce (WHITESIDE, 1976), em razão da similaridade morfológica, entretanto, mais tarde, em pesquisas demonstrou-se que os isolados apresentavam características bioquímicas, tais como, a produção de toxinas seletivas aos hospedeiros distintos, como consequência disto, foi designada como *A. alternata* (KOHMOTO; SCHEFFER; WHITESIDE, 1979) e, em seguida, referida de forma mais apropriada, como *Alternaria alternata* patótipo tangerina (Fr:Fr) Keissler (PEEVER; CARPENTER; TIMMER, 2004; CARVALHO et al., 2011). Assim, este patótipo causa doença, especificamente, em tangerinas e seus híbridos. Dessa forma, adota-se a designação de patótipo no estudo, pois considera-se o fato de que existem claras diferenças biológicas, bioquímicas e genéticas entre eles, os quais podem ser diferenciados por testes de patogenicidade, ensaios de toxinas ou marcadores moleculares (PEEVER; CARPENTER; TIMMER, 2004).

Ainda existem outras duas espécies de *Alternaria* que incitam doenças em citros, como a *Alternaria citri* e *Alternaria limicola*. A espécie *A. citri* causa a Podridão Negra de Alternaria (PNA) que acomete laranjas doces e limões, causando podridão de frutos (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2003). Enquanto a *A. limicola* é a responsável pela doença conhecida como mancha foliar em limão mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) que, por sua vez, é mais

restrita a essa variedade de citros, amplamente cultivada no México (AKIMITSU; PEEVER; TIMMER, 2004).

A. Alternata produz conídios de forma, cores e tamanhos variáveis, de 20 a 63 µm de comprimento x 9 a 18 µm de largura, cor oliva a marrom-escuro, dotados de 4 a 6 septos transversais e 1 ou mais septos longitudinais (ELLIS, 1993). O patógeno se desenvolve saprofiticamente em tecidos cítricos mortos ou em outros substratos, onde possa produzir grande número de conídios.

Os conídios possuem parede espessa e são resistentes ao ressecamento e outras condições adversas (SPÓSITO et al., 2003). A liberação dos esporos está relacionada com a ocorrência de chuvas e mudanças bruscas na umidade relativa, ou seja, uma vez formados, quando há uma redução brusca de umidade relativa, eles são facilmente disseminados pelo vento até a superfície de frutos ou para outros órgãos de plantas, iniciando novas infecções (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Uma vez atingido o interior do tecido, o patógeno começa a liberar uma toxina específica ao hospedeiro, cuja função é garantir a destruição das células ao redor do ponto de penetração e assim garantir os nutrientes para sua sobrevivência (STUART et al., 2009), causando necrose rápida dos tecidos. Esta toxina mata as células vegetais para permitir a infecção e a colonização dos tecidos pelo fungo, possuindo papel fundamental na expressão dos sintomas e na ocorrência da doença na planta hospedeira (SPÓSITO et al., 2003). As condições ideais para infecção ocorrem com temperaturas em torno de 20 a 27 °C e 10 a 12 horas de molhamento foliar contínuo, aparecendo os sintomas de um a dois dias (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000). A toxina que afeta as variedades de tangerinas é denominada HST – host specific toxine (toxina específica ao hospedeiro). Estudos sobre a toxina produzida por *A. alternata* (toxina ACT) mostram que ela tem ação rápida e causa extravasamento celular (STUART et al., 2009).

O patógeno *A. alternata* apresenta uma alta variabilidade genética (DINI-ANDREOTTI et al., 2009) e se reproduz assexuadamente por meio de mitose e a variabilidade pode ser ampliada devido o ciclo parassexual. Apesar do ciclo sexual de *A. alternata* não ter sido observado, o ciclo parassexual é um processo que amplia a variabilidade em fungos imperfeitos. Ele consiste, basicamente, na fusão de hifas e em seguida a formação de um núcleo diplóide pela fusão ao acaso dois dois núcleos haplóides, seguido de haploidização e possível crossing over mitótico (CASELA; GUIMARÃES, 1996).

Dessa forma, os indivíduos descendentes serão diferentes dos parentais que os originaram e assim, a diversidade genética dentro de populações de patógenos podem aumentar.

Visto que, todos os caracteres, morfológicos observáveis nos fungos, tais como, cor e crescimento micelia, cor e tamanho dos conídios, esporulação e os moleculares são utilizados para quantificar a diversidade populacional e entre e dentro de espécies de fungos fitopatogênicos.

4. Marcadores Moleculares

São utilizados diversos tipos de marcadores moleculares para o estudo da variabilidade genética de gêneros de *Alternaria*, como exemplo o RFLP que foi analisada para verificar a variabilidade de *A. alternata* (ADACHI; WATANABE; TSUBE, 1996). Já os marcadores AFLP foram empregados para o estudo da variabilidade de *A. solani* (MARTINEZ; SNOWDON; KUHNEMANN, 2004) e *A. brassicicola* (BOCK et al., 2002). Os marcadores RAPD-PCR são os mais utilizados para este gênero, pois além do baixo custo, obtém-se elevados níveis de polimorfismo, entretanto, ocorre uma baixa repetibilidade dos resultados, podendo reduzir a eficiência (GHERBAWY, 2005).

O ISSR (Simple Sequence Repeats) amplification (ISSR) é um dos marcadores moleculares mais utilizados nos estudos genéticos de fungos filamentosos, pois as sequências de DNA que flanqueiam os ISSRs são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores específicos que amplificam via PCR fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos e com reproducibilidade (SILVA, 2014). A diferença nos tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados e a repetibilidade dos resultados, devido a alta especificidade dos primers ISSR, fazem dessa técnica ser altamente utilizada e com dados confiáveis.

Os ISSRs possuem diversas vantagens, como: 1) natureza codominante e multialélica; 2) por serem altamente polimórficos, permitem discriminações precisas, mesmo de indivíduos altamente relacionados; 3) são abundantes e uniformemente dispersos em todo o genoma do patógeno; 4) podem ser eficientemente analisados por PCR, pois não precisa de conhecimento prévio de uma sequência de DNA e é responsável por produzir um grande número de ampliações. Além dos ISSRs serem muito frequentes e distribuídos ao acaso ao longo do genoma, permite a cobertura completa dos cromossomos de uma determinada espécie e podem ser utilizados para o mapeamento de genomas, que são ideais para a identificação e discriminação de genótipos e para estudos de variabilidade genética de populações de fungos (SILVA, 2014).

5. Métodos Alternativos no Controle da Mancha Marrom de Alternária

A união de vários métodos de controle, como exemplo as práticas culturais na formação dos pomares, proporcionam áreas com bastante circulação de ar, maior espaçamento entre as plantas, cuidados com a adubação e sobretudo a nitrogenada (MENDONÇA, 2005). O controle químico utilizando moléculas com ação já comprovadas contra o fungo a partir das estrobilurinas, dicarboximidas, triazóis e ditiocarbamatos (ALVA; GRAHAM, 1991). E o genético que já dispõem no mercado, duas variedades resistentes: ‘Clementina’ (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka) e ‘Thomas’ (*Citrus reticulata* Blanco) e dois híbridos: ‘Clementina Minneola’ (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka x Tangelo e *Minneola*) e ‘Freemont’ (*C. clementina* hort. ex Tanaka x *C. reticulata* Blanco) (PIO, 1997) tem sido bastante eficientes no controle da MMA em citros.

5.1 Biológico

O gênero *Trichoderma* spp. é conhecido há mais de 200 anos, por apresentar fungos filamentosos, não patogênicos, pertencente à ordem Hypocreales, responsáveis por promover o crescimento de plantas e auxiliar na germinação de sementes (DOLINSK, 2006). E também, por ser importante no biocontrole de fitopatógenos, devido a produção de substâncias tóxicas (WOO et al., 2006) podendo degradar celulose, hemicelulose (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010) exercendo o antagonismo contra vários fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, dentre outros, que causam prejuízos em diversas culturas tais como maçã (*Malus domestica* Borkh), morango (*Fragaria vesca* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.), beterraba (*Beta vulgaris* L), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* L.) (MAPA, 2015).

A indução de resistência de algumas linhagens de *Trichoderma* sp. se dá através da capacidade de desencadear uma série de alterações morfológicas e bioquímicas no vegetal, levando à ativação dos mecanismos de defesa contra diversos fitopatógenos (LUCON et al., 2010) através da ação direta ou indireta como a antibiose que inibe ou suprime a incidência do patógeno, devido à produção de diversas substâncias tóxicas, voláteis e não voláteis, com amplo espectro de atividade antimicrobiana (STANGARLIN et al., 2011).

Já a competição pode ser explicada através da interação do antagonista com o hospedeiro (patógeno). Onde a população do patógeno têm crescimento e sobrevivência prejudicados, devido a disputa por nutrientes ou espaço com o antagonista, ocorrendo deslocamento no sítio de infecção e impedindo a germinação de propágulos ou o processo de infecção na planta (SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010).

O micoparasitismo ocorre quando o antagonista utiliza o fitopatógeno como alimento, pois suas hifas se enrolam através de estruturas denominadas apressórios, degradam a parede celular pela secreção de enzimas líticas (quitinases, celulasas, glucanases e proteases) e agem de forma sinérgica na degradação da parede celular do hospedeiro, apresentando um importante papel no mecanismo de biocontrole (MARTIN et al., 2007).

Trichoderma asperellum (Samuels, Lieckf. e Nirenberg, Sydowia) é uma espécie ainda pouco estudada, porém, tem-se mostrado eficiente como agente de controle biológico através da produção de antibiótico peptídicos da superfamília das trichotoxinas (CHUTRAKUL; PEBERDY, 2005) e também do micoparasitismo contra diversos fungos fitopatogênos.

5.2 Pau-ferro

A espécie *Caesalpinia ferrea* (Benth). Ducke pertence a família Fabaceae, popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro. Planta perenifólia a semi-decídua, nativa da mata atlântica, ocorre do Sudeste ao Nordeste do Brasil, nas florestas pluviais de encosta atlântica (floresta ombrófila densa) (PATRO, 2013).

Tem sido bastante estudada devido os compostos antimicrobianos contidos no extrato e que tem mostrado alta eficiência no controle de doenças, pois, caracterizam-se como importantes fontes de compostos bioativos (fenólicos totais e ácido gálico) presentes na estrutura química dos mesmos, com propriedades biológicas, apresentando efeito inibitório sobre a ação de diversos fungos, tornando um método eficiente, devido ao aumento da atividade antioxidante e ativação dos mecanismos de defesas de frutos e de plantas (SOUSA, 2009).

Esses compostos presentes no pau-ferro são fundamentais na construção de componentes das paredes celulares, estão também associados à síntese das vitaminas, enzimas, hormônios e polifenóis (PINTO, 2013), capturando radicais livres, fontes de compostos bioativos, enquadrando-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis e as ligninas (SHAHIDI; NACZK, 2004).

5.3 Quitosana®

É um polímero natural de cadeia similar à da celulose (1-4) 2-amino- 2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina) atóxico e biodegradável, obtido por meio da desacetilação alcalina da quitina. Polissacarídeo encontrado naturalmente no exoesqueleto de insetos e crustáceos (DASH et al., 2011), solúvel em soluções aquosas, diluídas em ácidos orgânicos e inorgânicos. Apresenta uma alta bioatividade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade

seletiva, ação polieletrólítica, atividade antimicrobiana e habilidade em formar gel (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Por ser um produto natural, renovável e não apresentar nenhuma toxicidade ao homem este polímero tem sido proposto como um produto potencialmente atraente para usos diversos, como na área alimentícia, biotecnologia, produtos farmacêuticos, proteção ambiental e na agricultura (FREDDO et al., 2014).

Tem sido muito difundido por ser um biofilme incolor, comestível, de consistência gelatinosa, que protege a superfície externa dos frutos, legumes e sementes, reduzindo a incidência de patógenos e conservando as características físico-químicas, prolongando o período de conservação dos frutos e minimizando ou substituindo o uso de fungicidas (ASSIS; BRITTO, 2014).

Segundo Berger; Stamford; Stamford (2011) a quitosana pode atuar de três formas distintas na defesa vegetal, inibindo o crescimento de fungos devido ao acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e induzindo a produção da quitinase, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase e peroxidase, promovendo a lignificação e atrasando o aumento da atividade polifenoloxidase durante o armazenamento.

6. Indução de Resistência

A indução envolve uma complexidade funcional, espacial e temporal que inicia-se com o reconhecimento pelo hospedeiro de sinais exógenos provenientes do patógeno, bem como, agentes bióticos ou abióticos, que continua com os mecanismos de transdução desses sinais e resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica, onde ativa os mecanismos de defesa como a resistência sistêmica adquirida e resistência sistêmica induzida que são fenômenos distintos, mas fenotipicamente semelhantes, em que as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução, mas também em outros locais distantes dele (CARVALHO, 2012).

O termo “adquirido” refere-se quando o elicitor é um agente patogênico ou parasita, já o termo “induzido” é empregado quando esse agente é benéfico, simbiote ou abiótico, como os agentes indutores bióticos que são as leveduras, exopolissacarídeos bacterianos, rizobactérias e fungos promotores de crescimento (*Trichoderma* spp.), como também os indutores abióticos, como os extratos de plantas, silício (Si), ácido salicílico (AS), ácido D-Laminobutírico (BABA), quitosana, cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico, acibenzolar-

S-metil (ASM), fosfato de potássio monobásico e ácido jasmônico (AJ) ativam os mecanismos de defesa latentes (defesas bioquímicas e estruturais pós-formadas) existentes nas plantas (STANGARLIN et al., 2011).

Os indutores são capazes de ativar mecanismo de defesa estruturais, formados por papilas, halos, maior lignificação da parede celular, suberização, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, como também de natureza química, como as fitoalexinas entre outras, que são formadas a partir da síntese de substâncias com ampla ação antimicrobiana, e possuem alta velocidade de acúmulo (FERNANDES, 2014).

As fitoalexinas pertencem a diferentes grupos químicos, dentre eles os isoflavonóides e sesquiterpenais, além dessa evidência outros agentes elicitores presentes podem ser citados como os alcalóides, flavonóides, terpenóides, cumarinas, sulfitos, glucosídios, taninos, purinas, ácidos graxos orgânicos. Visto que, estes compostos podem se acumular até níveis suficientes para limitar o crescimento do patógeno e são tóxicas para protoplastos (células vegetais sem parede celular), atuam de forma direta sobre o agressor e também causem a morte do tecido infectado, gerando a lesão típica da hipersensibilidade, sendo um dos fatores decisivos para o estabelecimento da infecção, fazendo parte das estratégias de defesa selecionadas ao longo da evolução, podendo ser o principal mecanismo de resistência das espécies vegetais (STANGARLIN et al., 2011).

O peróxido de hidrogênio são substâncias candidatas ao sinal sistêmico indutor de resistência sistêmica adquirida. É uma das mais estudadas, com vários indícios sugerem sua participação nas respostas de defesa. Na verdade, processos oxidativos em geral parecem ter papel crucial nos estágios iniciais da indução dessas respostas. Embora o oxigênio molecular, essencial ao metabolismo aeróbico, seja muito pouco reativo, é fonte potencial de formas reativas. Nos vegetais, os cloroplastos (onde ocorre a fotossíntese, liberando oxigênio), são fontes particularmente ricas de radicais livres, moléculas muito reativas, por terem um elétron livre, e tóxicas para as células (MARTELLI; NUNES, 2014).

Normalmente os níveis de espécies reativas de oxigênio são baixos nas células vegetais, mas sua produção cresce em infecções por organismos vivos ou em processos foto-oxidativos decorrentes de estresses não-biológicos e que a primeira molécula originada do oxigênio, muito reativa, é o íon superóxido (O_2^-), que pode não só romper certas ligações químicas de compostos orgânicos, mas também originar outras espécies oxidantes, como o H_2O_2 e que este, além de tóxico para as células, porque inativa certas enzimas do ciclo de Calvin (que fixa o gás carbônico atmosférico), pode reagir com o íon superóxido gerando outros radicais livres, como a hidroxila (OH^-), ainda mais reativa e tóxica (BARROS et al., 2010).

As PR-proteínas (PRPs) são proteínas de natureza ácida, sintetizadas em respostas ao estresse biótico ou abiótico. Sendo acumulada *in situ* na folha ou *ex situ*, no interior dos tecidos da planta, como um dos eventos da resistência sistêmica adquirida. A infecção de plantas por fungos, bactérias e vírus, entre outros microrganismos, frequentemente conduz a uma resposta de defesa do hospedeiro através de mecanismos de eficiência variável contra o fitopatógeno (SILVA et al., 2012).

O papel das PRPs na resistência de plantas contra microrganismos patogênicos pode ser tanto direto como indireto. Uma ação direta como a inibição do crescimento do patógeno ou da germinação de esporos, representa uma concepção simplificada da defesa de plantas contra a entrada de agentes patogênicos. Neste sentido, em muitos casos, estas proteínas apresentam atividade antimicrobiana *in vitro*. No entanto, em sua maioria, PRPs possuem uma maior importância na ação indireta, ou seja, no processo de indução de resistência, como por exemplo, na ação preventiva contra penetração de patógenos, por ação oxidativa de componentes da parede celular vegetal por meio de peroxidases (PR-9), ou envolvimento na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro, como na ação de oxalato oxidases (PR-15) (STANGARLIN et al., 2011).

Um dos mais eficientes mecanismos é a reação de hipersensibilidade onde há estímulo na produção de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta. Essas proteínas incluem as proteínas estruturais formadas por glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e glicina e as enzimas peroxidases que estão envolvidas na lignificação, e que quando incorporadas à matriz extracelular, impedem que o patógeno entre nos tecidos das plantas. Existem também as enzimas do metabolismo secundário, que estão envolvidas na biossíntese de antibióticos e as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa (VEIGA et al., 2010).

Os compostos fenólicos são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes e são tóxicos aos patógenos. Os ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico são exemplos de alguns desses compostos. Algumas formas de fenóis podem ser convertidas em derivados com radicais de oxigênio, extremamente reativos, tornando-se muito tóxicos. Os fenóis possuem, pelo menos, um anel benzênico, com um ou mais grupos hidroxila, livres ou substituídos. A biossíntese do anel benzênico é um dos processos fundamentais da biologia, com significância fisiológica, genética, fitoquímica e ecológica para a planta (ALVARENGA; SILVA; OLIVEIRA, 2015).

As enzimas polifenoloxidasas e peroxidases são geralmente elevada em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de

defesa ou na senescência e lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos, responsável pelo aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

Entretanto, a identificação de componentes chaves das vias de transdução de sinais e o entendimento de como os processos de fixação do patógeno ao hospedeiro e de penetração funcionam, em nível molecular, poderão resultar em técnicas eficientes no controle de doenças, o que representa um importante passo para as novas estratégias no manejo de doenças. Visto que, um dos resultados dessa nova tecnologia deverá ser a redução no uso dos defensivos tradicionais, o que vem de encontro com a preocupação mundial no que diz respeito à preservação do meio ambiente e a a saúde humana (BARROS et al., 2010).

7. Desenvolvimento e Fisiologia da Maturação do Fruto e a Importância da Preservação das Características Pós-colheita

Após a colheita, o fruto se encontra mais suscetível a degradação, impactos e as doenças, e, uma vez desligado da planta, inicia-se um contínuo processo de modificações metabólicas que levam ao desenvolvimento de importantes características sensoriais, como adoçamento, decorrente das transformações do amido em açúcares solúveis mais comuns nos frutos são a frutose, glicose e sacarose, que, juntamente com os ácidos orgânicos fornecem a maior contribuição para o sabor do fruto (ABREU, 2010), diminuição da acidez e desaparecimento da adstringência, mudança de coloração, em consequência do desaparecimento da clorofila e a síntese de outros pigmentos, bem como transformações na textura (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Durante o amadurecimento, ocorre um grande número de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares, como os processos anabólicos e catabólicos que à medida que os substratos são convertidos em moléculas mais simples e ATP, são usados para dar suporte à intensa atividade metabólica e constitui uma eficiente reserva energética dos frutos, através de sua oxidação no ciclo de Krebs (GUIMARÃES et al., 2013).

A degradação da clorofila é outro processo predominante que influencia na mudança de cor dos frutos, em função das mudanças de pH, do aumento dos processos oxidativos, da ação das clorofilases e de ácidos orgânicos que são produtos intermediários das vias metabólicas e tendem a diminuir com o amadurecimento, em decorrência do processo respiratório ou de sua conversão em açúcares nos frutos (BACKER, 2015).

A diminuição da firmeza da polpa durante o amadurecimento é em função, principalmente, da perda da integridade da parede celular que são compostas por moléculas poliméricas constituintes da parede celular, como celulose, hemicelulose e pectina, gerando alterações na parede celular e levando ao amolecimento da polpa (SANTOS et al., 2014).

Outros processos, em menor extensão, também podem levar ao amolecimento dos frutos, como a degradação do amido e perda excessiva de água. A atividade de enzimas, como as poligalacturonases e/ou celulasas, responsável pela degradação das paredes celulares, tendo as atividades aumentadas com o início do amadurecimento e senescência (PESINI, 2012).

Essas mudanças envolvem complexas transformações no metabolismo dos frutos, as quais são decorrentes do aumento da atividade enzimática e estão associadas a mudanças da atividade respiratória e biossíntese do etileno. Uma vez iniciado o amadurecimento, têm seguimento os processos de senescência, período subsequente ao desenvolvimento do fruto, durante o qual o crescimento cessou e os processos bioquímicos degradativos substituem os de síntese, resultando na morte dos tecidos (ROCHA et al., 2010).

Entretanto, estudos sobre pós-colheita de frutos visam equilibrar as transformações metabólicas (aspectos físicos, físico-químicos, químicos e bioquímicos) que ocorrem no ciclo vital de um vegetal (CHITARRA; CHITARRA, 2005), reduzindo as perdas causadas por patógenos e por distúrbios fisiológicos, garantindo a integridade dos mesmos, proporcionando o produto final de alta qualidade, com frutos saudáveis, coloridos, aromáticos, saborosos e com alto valor nutritivo e, proporcionando uma ampliação do tempo de armazenamento sem, contudo, alterar suas características físicas, organolépticas e nutricionais (SOUSA et al., 2015). Permitindo competir com os demais países exportadores e atender aos mercados consumidores, cada vez mais exigentes quanto à qualidade e segurança do produto, bem como às normas ambientais e sociais (SILVA et al., 2011), favorecendo a crescente exigência do mercado consumidor por frutas de alta qualidade e com tecnologias alternativas para pós-colheita, substituindo os insumos poluentes e não renováveis (NEGREIROS et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. R. de. **Monitoramento de alterações físicas, química e fisiológicas durante o amadurecimento de goiabas cv “Pedro Sato”**. 2010. 94f. Tese (Doutorado). Universidade federal de Lavras, Lavras-MG. 2010.
- ADACHI, Y.; WATANABE, H.; TSUBE, T. Relationships between genetic polymorphisms and fungicide resistance with in *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, p.1248-1254, 1996.
- AKIMITSU, K.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Molecular ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Plant Pathology**, Oxford, v.4, n.6, p.435-446, 2003.
- ALVA, A.K.; GRAHAM, J.H. The role of copper in citriculture. **Advances in Agronomy**, San Diego, n.1, p.145-170, 1991.
- ALVARENGA, R.F. da S.; SILVA, D.R.C.; OLIVEIRA, R.R. de. Síntese de Cumarinas: Análise Quantitativa de Rendimento da Hidroarilação de Propiolatos com Fenóis. **VII Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica**, 1f. 2015.
- ASSIS, O.B.G; BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal Food Tecnology**, Campinas – SP, v.17, n.2, p.87-97, 2014.
- BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C. de C.; JULIATTI, L.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlandia,-MG, v.26, n.2, p.231-239, 2010.
- BECKER, F.S. **Desenvolvimento, caracterização e atividade antioxidante de marmelada-de-cachorro** (Schum.). 2015. 113p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 2015.
- BELLA, P.; GUARINO, C.R.; CATARA, A. Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v.83, p.231, 2001.

BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Spain, v.12, n.4, p.195-215, 2011.

BOCK, C.H.; THRALL, P.H.; BRUNAKER, C.L.; BURDON, J. Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprint. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, n.4, p.428-434, 2002.

CANIHOS, Y.; ERKILIC, A.; TIMMER, L.W. First reporter of *Alternaria* Brown spot of *Minneola tangelo* in Turkey. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.10, 1214 p. 1997.

CARVALHO, N.L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria-RS, v.7, n.7, p.1379-1390, 2012.

CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; CAMARGOS, R.B.; OLIVEIRA, D.F.; SCOLFORO, J.R.S.; CARVALHO, D.A. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micología**, Malden, v.28, n.4, p.173–178, 2011.

CASELA, C.R.; GUIMARÃES, F.B. Especialização fisiológica de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo-RS, v.4, p.75-93, 1996.

CASTRO-CAICEDO, B.L.; LEGUIZAMON, C.; LOPEZ, J.A. La mancha foliar de los cítricos em la zona cafetera. **Avances Técnicos Cenicafé**, Chinchiná, n.198, p.26, 1994.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (ed.). **Citrus**: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltda., 1975, p.14-20.

CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 2005. 785p.

CHUTRAKUL, C.; PEBERDY, J.F. Isolation and characterization of partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n.252, p.257–265, 2005.

CITRICULTURA. **Citricultura paulista**. Disponível em: <<http://al-sp.jusbrasil.com.br/noticias/100027157/citricultura-paulista-autoridades-e-liderancas-discutem-medidas-que-contemplem-setor>>. Acesso em: 12 Jan. 2013.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. 'Chitosan -A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications'. **Progress in Polymer Science**, Amsterdam, v.36, n.8, p.981–1014, 2011.

DINI-ANDREOTE, F.; PIETROBON, V.C.; DINI-ANDREOTE, F.; ROMÃO, A.S.; SPÓSITO, M.B.; ARAÚJO, W.L. Genetic variability of brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by aflp and rapd techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo-SP, v.40, p.670-677, 2009.

DOLINSKI, C. Developing a research and extension program for control of the guava weevil in Brazil using entomopathogenic nematodes. Abstract, **XXXXV Anual Meeting of the Society of Nematologists**, Hawai, Lihue, n.38, p.270, 2006.

DUZZIONI, A.G. **Avaliação da atividade antioxidante e quantificação dos principais constituintes bioativos de algumas variedades de frutas cítricas**. 2009. 115f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo-SP. 2009.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Oxon: CAB International, 1993.

FAO- OCDE- **FAO PERSPECTIVAS AGRÍCOLAS 2015-2024**. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 03 Dez. 2015.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B.; PIO, R.M; CASTRO, J.L. Seleção de tangerinas e híbridos de citros para a tolerância à Mancha Marrom de *Alternaria (Alternaria alternata* Keissler). **Citricultura atual**, Cordeirópolis-SP, n.45, v.8, p.08-10, 2005.

FERNANDES, L.H.M. **Atividade antioxidante em cafeeiro e proteção contra cercosporiose por indutor de resistência e fungicidas**. 2014. 78f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 2014.

FREDDO, Á.R.; MAZARO, S.M.; BRUN, E.J.; JÚNIOR, A.W. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.44, n.1, 2014.

FREITAS, L.D. **Seleção de isolados de *Trichoderma* sp. provenientes da região sul do Brasil para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2014. 39f. Monografia. Centro Universitário de Goiás, Goiás-GO. 2014.

GARCIA, W.M. **Comportamento *in vitro*, métodos de inoculação e fontes de resistência à *Fusarium guttiforme* em abacaxizeiro**. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado do Mato Grosso, Mato Grosso-MT. 2013.

GHERBAWY, Y.A.M.H. Genetic variation among isolates of *Alternaria* spp. From select Egyptian crops. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlim, v.38, n.2, p.77-89, 2005.

GIONGO, C.R.; MENDES, J.M.R.; SANTOS, F.K. Desenvolvimento, saúde e meio ambiente. **Revista Serviço Social e Sociedade**, São Paulo-SP, n.123, p.501-522, 2015.

GOES, A.; MONTES de OCA, A.G.; REIS, R.F. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* em mandarina ‘Dancy’ em el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.26, p.386, 2001.

GOMES, W.A. **Estado nutricional, produtividade e qualidade de tangerina cv. ‘Dancy’ sob adubação verde e poda no Brejo paraibano**. 2010. 55f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, Paraíba. Areia-PB. 2010.

GONÇALVES, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina**. 2008. 50f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo-SP. 2008.

GUIMARÃES, M. de A.; TELLO, J.P. de J.; DAMASCENO, L.A.; VIANA, C. dos S.; MONTEIRO, L.R. Pré-embebição de sementes e seus efeitos no crescimento e desenvolvimento de plântulas de melancia. **Revista Ceres**, Viçosa-MG, v.60, n.3, p.442-446, 2013.

HATTA, R.; ITO, K.; YOSHITSUGU, H.; TANAKA, T.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, M.; AKIMITSU, K.; TSUGE, T. A conditionally dispensable choromo some controls host-specific

pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. **Genetics**, Pittsburgh, v.161, p.59-70, 2002.

HERRERA, L. La mancha parda de los cítricos em Cuba. **Levante Agrícola**, Valência, v.31, n.229, p.49-50, 1992.

HORTIFRUTI: **Espaço Nutrição**. Disponível em: <<http://hortifrutiuniao.com/espaco-nutricao/>>. Acesso em: 10 Abr. 2016.

IAC- **Avaliação de germoplasma do Banco Ativo de Germoplasma de Citros para tolerância à mancha marrom de alternária** - Projeto Financiado pelo Fundecitrus. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/scriptlattes/2007/Pj-0.html>>. Acesso em: 10 Abr. 2016.

IBGE - **Instituto brasileiro de geografia e estatística**: Comentários. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2011/pam2011_comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2011/pam2011_comentarios.pdf)>. Acesso em: 13 Jan. 2015.

KOHMOTO, K.; OTANI, H.; TUSGE, T. *Alternaria alternata* pathogens. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. v.2. Oxford: Pergamon, 1995. p.3-22.

KOHMOTO, K.; SCHEFFER, R.P.; WHITESIDE, J.O. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, n.6, p.667-671, 1979.

KUSABA, M.; TSUGE, T. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host specific toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.9, p.3055- 3062, 1994.

KIELY, T.B. Brown spot of Emperor mandarin. **Agricultural Gazette of new South Wales**, Sidney, v.75, n.2, p.854-856, 1964.

LUCON, C.M.M.; GUZZO, S.D.; DE JESUS, C.O.; PASCHOLATI, S.F.; GOES, A. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection**, Amsterdam, v.29, n.7, p.66-772, 2010.

MAPA: revista de políticas agrícolas. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/RPA%203%202015.pdf>. Acesso em: 11 Fev. 2015.

MARÍN, J.E.; FERNÁNDEZ, H.S.; PERES, N.A; ANDREW, M.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. First report of *Alternaria* Brown spot of citrus cause by *Alternaria alternata* in Peru. **Phytopathology**, St. Paul, v.90, n.5, 686 p. 2006.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, Barretos-SP, v.66, n.3, p.54-57, 2014.

MARTIN, K.; MCDOUGALL, B.M.; UNKLES, S.E.; SEVIOUR, R.J. The three b-1,3 glucanases from the fungus *Acremonium blochistarin* appear to be encoded by separate genes. **Mycological Research**, London, v.110, p.66-74, 2007.

MARTINEZ, S.P.; SNOWDON, R.; KUHNEMANN, J.P. Variability of Cuban and international os *Alternaria solani* form diferente host and localities: AFLP genetic analysis. **European Journal of Plant Pathology**, St. Paul, v.110, p.399-409, 2004.

MENDONÇA, V. **Poda de recuperação em tangerineira ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata* Blanco)**. 2005. 61f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Universidade de Lavras, Lavras-MG. 2005.

MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F.C.P., POMPEU JÚNIOR, J. **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.1-21.

NEGREIROS, R.F.Z. de; SALOMÃO, L.C.C.; PERREIRA, O.L.P.; CECON, P.R.; SIQUEIRA, D.L. Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-‘prata’ com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.35, n.1, p.051-058, 2013.

PATRO, P. **Pau-Ferro-2013**. Disponível em: <<http://www.jardineiro.net/plantas/pau-ferro-caesalpinia-ferrea.html>>. Acesso em: 29 Abr. 2014.

PEEVER, T.L.; CARPENTER, L.B.; TIMMER, L.W. Molecular systematics of citrus - associated *Alternaria* species. **Mycologia**, Philadelphia, v.96, n.1, p.119-134, 2004.

PELISSARI, L.Q. **Tangerina ponkan é rica em antioxidantes e diminui o risco de Alzheimer. Centrais de abastecimento do Espírito Santo – CEASA/ES**. Disponível em:< www.ceasa.es.gov.br>. Acesso em: 02 Set. 2013.

PERES, N.A.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreakers of alternaria brown spot of citrus in Brazil and Argentine. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.6, 750p. 2003.

PESINI, J. **Avaliação de danos mecânicos nas etapas de transporte, beneficiamento e comercialização de peras**. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul-RS. 2012.

PINTO, K.M.S. **Substâncias bioativas de extratos vegetais no manejo da mancha marrom de alternaria** (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*). 2013. 119f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. 2013.

PINTO, M. dos S.T.; RIBEIRO, J.M.; OLIVEIRA, E.A.G. de. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre-RS, v.9, n.2, p.241-248, 2011.

PIO, R.M. **Estudo de variedades do grupo das tangerinas: caracterização e avaliação dos frutos**. 1997. 89p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo-SP. 1997.

OLIVEIRA, C.A.; BRUNINI, M.A. de; NUNES, G.S. Qualidade da tangerina ‘ponkan’ comercializada na CEAGESP entreposto de Ribeirão Preto-SP. **Nucleus**, Ituverava-SP, v.11, n.2, 2014.

REIS, R.F.; GOES, A.; MONDAL, S.M.; TIMMER, L.W. Effectiveness of fungicides and susceptibility of fruit and leaves of tangerines, tangor and tangelos to infection by *Alternaria alternata*, the cause of brown spot. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna-SP, p.11-12, 2006.

RICE, E.L. **Allelopathy**, 2.ed. New York: Academic Press, 1984. 422p.

ROCHA, R.H.C.; SILVA, E. de O.; SALOMÃO, L.C.C.; VENTRELLA, M.C. Caracterização morfoanatômica do melão gália no ponto de colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.32, n.2, p. 375-385, 2010.

RODRIGUEZ, A.B.F.; MENÉNDEZ, D.C.; FUNDORA, D. GONZÁLEZ-PEÑA; GARCÍA, M.C.N. Nuevos productos naturales para la agricultura: las oligosacarinas. **Cultivos Tropicales**, San José- Costa Rica, v.36, n.1, p.111-129, 2015.

ROSSETI, V.V. Doenças causadas por vírus e semelhantes. In: ROSSETI, V.V. (Ed.) **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba:Fealq/Fundecitrus. 2014, p.59-91.

SANTOS, A.P.G.; VIANA, T.V.A.; SOUSA, G.G.; Ó L.M.G.; AZEVEDO, B.M.; SANTOS, A.M. Produtividade e qualidade de frutos do meloeiro em função de tipos e doses de biofertilizantes. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista-BA, v.32, p.409-416, 2014.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appelied microbiology and biotechnology**, Berlim, v.87, p.87-799, 2010.

SCHUTTE, G.C.; LESAR, K.H.; PELSER, P.T.; SWART, S.H. The use of tebuconazole for the control of *Alternaria alternata* on “Minneola” tangelos and its potencial to control postharvest decay when applied as apre harvest spray. In: INTERNATIONAL CITROS CONGRESS, 7, 1992, Acireale: Proceendings. Acireale: **International Society of Citriculture**, Valência, Espanha, v.3, p.1070-1074, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources, Applications and Health Effects**. CRC Press, Boca Raton, 2004.

SHORESH, M.; HARMAN, G.E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, Califórnia, v.48, n.1-23, 2010.

SILVA, E.H. **Variabilidade genética e fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e identificação de QTLs de uma nova fonte de resistência do algodoeiro (*Gossypium* spp.) a esse nematoide**. 2014. 62f. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2014.

SILVA, H.A.P. da; GALISA, P. de S.; OLIVEIRA, R.S. da S.; VIDAL, M.S.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L. Expressão gênica induzida por estresses abióticos em nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.47, n.6, p.797-807, 2012.

SILVA, L.J.; TEIXEIRA, R.N.V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agroambiente**, Boa Vista-RR, v.6, n.1, p.47-52, 2012.

SILVA, R.A. da.; AGRA, A. da. C.; ALEIXO, D. de. L.; NÓBREGA, V.R. da.; DANTAS, E.A. Situação econômica e produtiva da cultura dos citros no estado da Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró-RN, v.6, n.3, p.39-48, 2011.

SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria alternata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.34, n.3, p.499-503, 1999.

SOLEL, Z. Alternaria brown spot on Minneola tangelos in Israel. **Plant Pathology**, Oxford, v.40, n.1, p.14-147, 1991.

SOUSA, A.A. de; SILVA, A.P.F. da; AZEVEDO, E. de; RAMOS, M.O. Cardápios e sustentabilidade: ensaio sobre as diretrizes do programa nacional de alimentação escolar. **Revista de Nutrição**, Campinas-SP, v.28, n.2, 2015.

SOUZA, M.C. **Reação de genótipos de tangerinas a *Alternaria alternata* e *Elsinoe fawcettii*: resistência, suscetibilidade e acúmulo de metabólitos**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo-SP. 2009.

SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L; RENAUD, M.S.A. Ocorrência de mancha marrom de Alternária em diferentes genótipos de citros nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.28, p.231, 2003.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel-PR, v.10, n.1, p.18-46. 2011.

STUART, R.M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, M.A. Alternaria Brown Spot. **Laranja**, Cordeirópolis-SP, v.30, n.1-2, p.29-44, 2009.

SWINGLE, W.T. The botany of Citrus and its relatives. Revisão de Philip C. Reece. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry**, Berkeley, California: University of California, 1967. v.1, cap.3, p.190-430.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. Minnesota: APS Press, 2000. 2.ed. 128p.

VEIGA, A.D.; VON PINHO, E.V. de R.; VEIGA, A.D.; PEREIRA, P.H. de A.R.; OLIVEIRA, K.C. de; VON PINHO, R.G. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v.34, n.4, 2010.

VICENT, A.; ARMENGOL, J.; SALES, R.; GARCIA-JIMENEZ, J. First report of alternaria brown spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v.84, n.9, 1044p. 2000.

VIEIRA, F.V.; VERISSIMO, M.P. Crescimento econômico em economias emergentes selecionadas: Brasil, Rússia, Índia, China (BRIC) e África do Sul, **Economia e Sociedade**, Campinas-SP, v.18, n.3, p.513-546, 2009.

WALTON, J.D. Host-selective toxins: Agents of compatibility. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1723-1733, 1996.

WHITESIDE, J.O. A newly recorded Alternaria-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.60, n.4, p.326-329, 1976.

WOO, S.L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, St. Paul, v.96, p.181-185, 2006.

DIVERSIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Alternaria alternata* PATÓTIPO TANGERINA

Andréa Celina Ferreira Demartelaere¹; Luciana Cordeiro do Nascimento¹;

¹Laboratório de Fitopatologia, PPGA/CCA/UFPB

Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Rodovia PB 079, Km 12 CEP 58397-000, Areia
- PB, e-mails: andrea_celina@hotmail.com, luciana.cordeiro@cca.ufpb.br

RESUMO- O fungo *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler patótipo tangerina é o agente etiológico da mancha marrom de alternaria (MMA) em tangerineiras, doença de grande importância econômica. Na Paraíba, a ocorrência da MMA em tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka) está associada a condições genéticas e do ambiente de crescimento do patógeno que influenciam na sua disseminação e reprodução, ou seja, na diversidade dentro e entre populações biológicas desse patógeno. O presente trabalho objetivou avaliar a diversidade em isolados de *A. alternata* patótipo tangerina por meios de aspectos morfofisiológicos e ISSR. Os experimentos foram realizados no LAFIT e LAPOA/UFPB/CCA, Areia-PB. Para a avaliação do crescimento micelial e esporulação foram utilizados 30 isolados incubados em meios de cultura V8 ágar, extrato de folha ágar (EF), aveia dextrose ágar (ADA), batata dextrose ágar (BDA), temperaturas 15, 25 e 35 °C no escuro, luz contínua e em luz alternada. O crescimento micelial (CM) foi avaliado em intervalos de 24 horas até sete dias e a esporulação foi quantificada em câmara de Newbauer a 10⁵ esporos/mL. A caracterização molecular foi realizada com 38 isolados por meio de marcadores ‘internal sequence simple repeat’ (ISSR) e a similaridade genética quantificada pelo índice de Jaccard. O delineamento experimental utilizado na caracterização morfofisiológica foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial, 30 isolados, quatro meios de cultura: AV, BDA, EF e V8, três regimes de luz: claro contínuo, luz alternada e luz contínua e três temperaturas: 15, 25 e 35 °C com 12 repetições, constituindo um total de 12.960 placas de Petri, considerando uma placa de Petri por repetição. A análise de variância dos isolados foi realizada para verificar diferenças no crescimento micelial e esporulação entre isolados nas diferentes condições do ambiente de cultivo utilizadas através do teste F ($p \leq 0,05$). Nesse caso, as médias foram agrupadas para analisar os efeitos dos regimes de luz, temperaturas e meios de cultura e das interações entres

estes sobre o crescimento micelial e a esporulação de *Alternaria alternata* patótipo tangerina. As médias gerais foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) e as demais pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares SISVAR[®] 5.3 e SAS/STAT[®] 9.3. A diversidade genética nos trinta e oito isolados avaliados foi determinada com base na presença e ausência de fragmentos de DNA amplificados por três *primers* e visualizados em géis de eletroforese. As imagens dos géis foram processadas no software BioNumerics[®] para análise de similaridade genética de Jaccard. O dendrograma de similaridade genética foi obtido pelas médias aritméticas dos grupos de isolados formados em pares de dados combinados (UPGMA). Independente do local de coleta e da condição de cultivo utilizada, todos os isolados apresentaram diferença estatística em relação ao crescimento micelial e esporulação. Os isolados de *A. alternata* patótipo tangerina coletados de Massaranduba-PB apresentaram alto crescimento micelial, esporulação e alta diversidade genética em relação aos demais isolados avaliados. De forma geral, o regime de luz contínuo, a 25 °C nos meios BDA e V8 foram os ideais para o crescimento micelial e esporulação dos isolados avaliados *A. alternata* patótipo tangerina, no entanto, escuro contínuo em meio AV foi melhor aos isolados de Pratânia-SP até o sétimo dia de avaliação. Todos os isolados apresentaram alta diversidade genética entre eles e ocorreu uma tendência de agrupamento por local demonstrada através dos marcadores morfofisiológicos e moleculares avaliados.

Palavras-chave: *Citrus tangerina*, Mancha marrom de alternaria, Marcadores ISSR, Variabilidade de fungos

DIVERSITY IN ISOLATES OF *Alternaria alternata* TANGERINE PATHOTYPE

ABSTRACT- The fungus *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler pathotype tangerine is the etiologic agent of Alternaria brown spot (MMA) in mandarin, of great economic importance disease. In Paraíba, the occurrence of MMA in tangerine 'Dancy' (*Citrus tangerine* hort. Ex Tanaka) is associated with genetic conditions and pathogen growth environment that influence the dissemination and reproduction, ie the diversity with in and between populations biological of this pathogen. This study aimed to evaluate the diversity in isolates of *A. alternata* pathotype tangerine by means of morphophysiological and ISSR aspects. The experiments were performed at LAFIT and LAPOA/UFPB/CCA, Areia-PB. For mycelial growth and sporulation were used 30 isolates incubated on V8 agar culture medium, agar extract of leaves (FE), oats dextrose agar (ADA), potato dextrose agar (PDA) were measured temperatures at 15, 25 and 35 °C in dark, continuous and alternating light light. The mycelial growth (CM) was evaluated at 24 hour intervals up to seven days and sporulation was quantified in a Neubauer chamber 10^5 spores/mL. Molecular characterization was performed with 38 isolated by markers 'internal simple sequence repeat' (ISSR) and quantitated using Jaccard genetic similarity index. The experimental design used in Morphophysiological characterization was completely randomized in a factorial arrangement, 30 isolates, four culture media: AV, BDA, EF and V8, three light regimes: continuous light, alternating light and continuous light and three temperatures: 15, 25 and 35 °C with 12 reps, making a total of 12,960 Petri dishes considering a Petri dish by repetition. Analysis of variance of the isolates was performed to verify differences in the mycelial growth and sporulation between isolates in different conditions of cultivation environment used by F-test ($P \leq 0,05$). In this case, the means were grouped together to analyze the effects of light regimes, temperatures and means of culture and the interactions between these on the mycelial growth and sporulation of *Alternaria alternata* pathotype tangerine. The overall averages were compared by the Scott-Knott test ($p \leq 0,05$) and the other by the Tukey test ($p \leq 0,05$). Statistical analyzes were performed using the software SISVAR[®] 5.3 and SAS/STAT[®] 9.3. The genetic diversity in this thirty eight isolates was determined based on the presence or absence of amplified DNA fragments of three primers and viewed on electrophoresis gels. Images of the gels were processed in BioNumerics[®] software for analysis

of genetic similarity Jaccard. The genetic similarity dendrogram was obtained by the arithmetic average of the individual groups formed in data matched pairs (UPGMA). Independent of the collection site and growing conditions used, all isolates showed statistical differences in relation to mycelial growth and sporulation. The isolates of *A. alternata* pathotype tangerine collected from Massaranduba-PB showed high mycelial growth, sporulation and high genetic diversity compared to other tested isolates. In general, the continuous light regime at 25 °C on PDA and V8 media was ideal for the mycelial growth and sporulation of the isolated *A. alternata* this pathotype tangerine, however, continuous darkness among the best AV was isolated from Pratânia-SP until the seventh valuation day. All isolates showed high genetic diversity among them and there was a grouping of tendency by location shown by markers morphophysiological and molecular aspects evaluated.

Key words: *Citrus tangerine*, Brown stain alternaria, Fungal variability, ISSR markers

1 INTRODUÇÃO

A variabilidade genética de *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler, patótipos de *Citrus* spp. pode estar associada às condições do ambiente ‘*in vivo*’ ou ‘*in vitro*’ de desenvolvimento desses fungos. Sendo uma das principais causas das variações genéticas dentro de uma mesma população, influenciando no surgimento de novos genótipos e novas combinações genéticas que envolvem a fusão de gametas, a recombinação de alelos durante o pareamento dos cromossomos homólogos, a segregação e a geração de descendentes viáveis (AZEVEDO, 2008; SANTOS, 2015).

Na Paraíba, a ocorrência da mancha marrom de alternaria em tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka) causada pelo patógeno *A. alternata* patótipo tangerina está associada a fatores ambientais como umidade, luminosidade e temperaturas elevadas que variam em torno de 25 a 30 °C (PULZ; MASSOLA JÚNIOR, 2009). Essas condições são importantes para a reprodução e disseminação de *A. alternata* patótipo tangerina. No entanto, pouco se conhece sobre a influência dessas variações do ambiente sobre a variabilidade genética do patógeno que causa sérios prejuízos aos citricultores, pois, reduz a qualidade e a produtividade dos frutos em diversas regiões produtoras no Brasil (TOFOLI et al., 2013). Entretanto, existe a necessidade de pesquisas dessa natureza, utilizando metodologias em ambientes controlados para posterior utilização das informações adquiridas com melhor e mais adequado manejo da mancha marrom de alternaria em tangerineiras.

Além das condições do ambiente de desenvolvimento, cada microrganismo requer necessidades mínimas nutricionais ao seu crescimento e esporulação. Notadamente, a concentração de nutrientes inseridas nos meios de cultura, luminosidade e temperatura podem potencializar o crescimento micelial e produção de conídios em fungos fitopatogênicos em menor período de tempo (CRUZ; PRESTES; MACIEL, 2009).

A eficiência de estratégias de manejo no controle de doenças é claramente dependente da compreensão do patógeno e a sua dinâmica populacional (COSTA et al., 2010). Por isso, estudos sobre variabilidade em populações de fungos pode constituir um importante instrumento de investigação. Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante para determinar o potencial de adaptação do organismo às diferentes condições ambientais e do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas sob o manejo das doenças (SOUZA, 2015). Desta forma, torna-se clara a importância de informações sobre esse patossistema, bem como, o manejo da mancha marrom de alternaria em tangerineiras no Estado de Paraíba.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi a diversidade de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina por meio de marcadores morfofisiológicos e moleculares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do Experimento

As análises morfofisiológicas foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT) e as moleculares, na área de biologia molecular do Laboratório de Análise de Produtos de Origem Animal (LAPOA), ambos pertencentes ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, PB.

2.2 Isolados de *A. alternata* Patótipo Tangerina

Os isolados utilizados no estudo foram provenientes de várias regiões produtoras da Paraíba, coletados no período de maior incidência da MMA, entre julho e outubro dos anos de 2012 e 2013. A coleta do material vegetal para isolamento foi realizada em 10 plantas de cada área de plantio, com espaçamento mínimo entre plantas de 50 m e amostragem em zigue-zague. Também foram adicionados às análises, três isolados do Estado de São Paulo e um de Portugal (Tabela 1).

Posteriormente, as amostras foram transportadas em sacos de papel identificados, acondicionadas em caixas térmicas e transportadas para o LAFIT, onde ocorreram os isolamentos, identificação morfológica e confirmação da patogenicidade dos isolados de *A. alternata* em frutos de Tangerineira ‘Dancy’.

Tabela 1. Isolados de *A. alternata* patótipo tangerina utilizados no estudo. UFPB, Areia-PB, 2015.

Identificação dos isolados	Variedades	Localidades
1, 2, 3, 4, 5, 6	Tangerina ‘Dancy’/(<i>Citrus tangerina</i>)	Lagoa Seca-PB
7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	Tangerina ‘Dancy’/(<i>Citrus tangerina</i>)	Massaranduba-PB
15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 36, 37, 38	Tangerina ‘Dancy’/(<i>Citrus tangerina</i>)	Matinhas-PB
27, 28, 29	Tangor ‘Fortune’/(<i>C. clementina</i> x <i>C. tangerina</i>)	Pratânia-SP
30	Tangerina/(<i>Citrus tangerina</i>)	Trás os Montes-PT
31, 32, 33, 34, 35	Tangerina ‘Dancy’/(<i>Citrus tangerina</i>)	Remígio-PB

Os isolados de *A. alternata* patótipo tangerina oriundos de São Paulo pertencem à Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP, e foram obtidos a partir de folhas sintomáticas de tangor 'Fortune' (*C. clementina* x *C. tangerina*) na região produtora de Pratânia-SP. O isolado de *A. alternata* patótipo tangerina proveniente de Portugal foi obtido a partir de frutos de tangerineira (*C. tangerina*) com sintomas típicos da MMA na região produtora de Trás os Montes-PT (Tabela 1).

2.3 Tratamento dos Isolados de *A. alternata* Patótipo Tangerina

Trinta e oito isolados foram obtidos a partir de fragmentos de 5 mm de diâmetro de frutos de tangerineiras coletadas em várias localidades da Paraíba. Em seguida, os fragmentos foram desinfestados por meio de lavagens em etanol 70%, hipoclorito 1% e água destilada esterilizada (ADE), inoculadas em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) (200 g batata, 20 g dextrose, 20 g ágar, 1000 mL ADE) acrescido do fungicida Carbendazin (methyl benzimidazol-2-ylcarbamate) na dose de 50 mL/100 L para inibir a proliferação de microrganismos contaminantes e incubados em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante sete dias (COLTURATO, 2006).

Para confirmar a identidade morfológica dos isolados, três discos de colônias fúngicas com 5 mm de diâmetro foram transferidos para o meio Carbonato de Cálcio (CaCO_3) (30 g de CaCO_3 , 20 g de sacarose, 20 g de ágar, 1000 mL ADE), responsável por induzir esporulação de *A. alternata* patótipo tangerina, mantidos em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999).

Após sete dias de cultivo em meio de CaCO_3 , a confirmação morfológica dos isolados foi realizada por meio da observação da pigmentação, textura e consistência, do verso e reverso das colônias desenvolvidas. As microestruturas coradas com azul de metileno foram observadas em lâminas de microscopia e a identificação foi confirmada observando as macro e micro estruturas conforme Rotem, 1998.

Logo em seguida, esporos foram coletados por meio do corte de fragmentos do meio de CaCO_3 colonizado com esporos que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 9 mL de ADE. Seguiu-se a diluição em série com a transferência de 1 mL da suspensão de esporos do tubo anterior para outro tubo com o mesmo volume de ADE, até o terceiro tubo. No terceiro tubo, 1 mL da suspensão de esporos obtida foi distribuída em três placas de Petri contendo Ágar-Água (AA) (20 g ágar, 1000 mL de ADE) e incubadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por no máximo 12 horas ou até ocorrer a germinação dos esporos.

As culturas monospóricas foram obtidas por meio da coleta de um único esporo visualizado no microscópio de luz, com ajuda da peça de Tarugo de Bronze que foi deselvolvida especificamente para este fim. Os isolados monospóricos foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA e incubados por sete dias em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) até o momento do uso. Em seguida, foram preservados em Castellani (1939).

2.4 Caracterização Morfofisiológica dos Isolados de *A. alternata* Patótipo Tangerina

2.4.1 Crescimento Micelial

O diâmetro micelial de trinta isolados de *A. alternata* patótipo tangerina foram medidos sob condições de B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) ajustadas em diferentes regimes de luz: escuro contínuo, luz alternada (12 horas claro e 12 horas escuro) e luz contínua, temperaturas: 15, 25 e 35 °C e meios de cultura: AV aveia dextrose ágar (65 g de aveia, 20 g de dextrose, 20 g de ágar, 1000 mL ADE), BDA batata dextrose ágar (200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar, 1000 mL, ADE), EF extrato de folha ágar (400 g de folhas de citros, 20 g de dextrose, 20 g de ágar, 1000 mL ADE) e V8 ágar (100 mL do suco V8, 20 g de ágar, 15 g de CaCO_3 , 900 mL ADE), (COLTURATO, 2006). O pH de todos os meios foram ajustados para 6,0 e em seguida, foi feita a esterilização em autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

As avaliações foram realizadas em intervalos de 24 horas, com uma régua graduada em milímetros, foi feito a medição do Crescimento Micelial (CM) (mm) pela média dos dois eixos ortogonais até atingir toda a placa de Petri (80 x 100 mm) que se deu aos sete dias de avaliação (SALGADO et al., 2003).

2.4.2 Esporulação

Foi obtida a partir da suspensão de esporos de cada isolado de *A. alternata* patótipo tangerina, adicionando 10 mL de ADE nas placa de Petri com a colônia pura do fungo. E com o auxílio de uma espátula estéril, os esporos foram liberados, em seguida, filtrados em dupla camada de gaze esterilizada, quantificados em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada a 10^5 esporos/mL.

2.5 Caracterização Molecular dos Isolados de *A. alternata* Patótipo Tangerina

2.5.1 Obtenção da Cultura Monospórica

De cada um dos trinta e oito isolados utilizados para caracterização molecular, foram transferidos cinco fragmentos de 5 mm² de discos miceliais para tubos de plástico tipo Falcon. Cada tubo continha 30 mL de meio BD batata dextrose (200 g de batata, 20 g de dextrose, 1000 mL de ADE). Os tubos com os isolados foram agitados diariamente em mesa agitadora, duas

vezes ao dia, por duas horas, durante sete dias em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após o crescimento micelial dos isolados nos tubos, o meio líquido BD foi retirado por meio de bomba a vácuo. Posteriormente, a massa micelial de cada isolado foi filtrada, pulverizada em nitrogênio líquido e acondicionada em microtubos de 2,0 mL.

2.5.2 Extração de DNA dos Isolados de *Alternaria alternata* Patótipo Tangerina e Marcadores ISSR

Para obtenção dos marcadores ISSR, cinco primers foram testados e três (Tabela 2) foram utilizados por produzirem maior polimorfismo de bandas nos géis de eletroforese com as PCRs dos isolados analisados (WAALS; KORSTEN; SLIPPERS, 2004).

A extração do DNA dos isolados foi realizada em microcentrifuga utilizando o método CTAB (RAEDER; BRODA, 1987), adaptado pelo kit de extração UltraClean® Microbial DNA com protocolo descrito pelo fabricante MO BIO laboratories Inc Carlsbad, CA., EUA. O DNA total extraído foi analisado em gel de agarose a 1% utilizando o corante GelRed Biotium® para visualização em luz ultravioleta (UV) e quantificação no espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Scientific. A concentração de DNA total extraído variou de 8 a 20 ng/μL e foram ajustadas a 10 ng/μL para as reações “Internal Simple Sequence Repeats” (ISSR).

Cada reação ISSR de 25 μL foi feita a partir da mistura de de 22,5 do Mix PCR da Invitrogen Life Technologies (22 U/mL recombinante *Taq* DNA polymerase, 22 mM Tris-HCL, 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP e estabilizadores), 1,5 μL de cada *primer* (10 pmol) e 1,0 μL do DNA de cada isolado.

Tabela 2. *Primers* ISSR utilizados na caracterização molecular de *A. alternata* patótipo tangerina. UFPB, Areia-PB, 2015.

<i>Primers</i>	Temperatura de anelamento	Sequências
CA1	45,5 °C	5'ACCACACACACACACA3'
CA2	46 °C	5'ATCACACACACACACA3'
CAC3	46,5 °C	5'ATGCACCACCACCAC3'

As reações ISSR foram realizadas utilizando o kit Platinum® PCR SuperMix da Invitrogen™ em termociclador Techne (TC-5000, Inc, Inglaterra), utilizando-se desnaturação inicial do DNA de 94 °C, por quatro minutos, seguidos de 40 ciclos com 94 °C por quarenta

segundos e a temperatura de anelamento variou de 45,5 a 46,5 °C, de acordo com o primer ISSR utilizado, com a extensão de 72 °C por dois minutos e extensão final de 72 °C por sete minutos.

Os produtos de PCR foram corados com Gel Red®, separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% de concentração e imerso em tampão TBE (0,45 M de Tis-Borato e 0,01 M EDTA). A corrida eletroforética foi realizada a 80 volts durante noventa minutos e os produtos de PCR foram visualizados em transluminador Gel Logic 212 PRO (Carestream Molecular Imaging Software – Version 5.0, Health, Inc, EUA).

Foi realizada uma análise entre os produtos de ISSR dos isolados por meio da obtenção das médias aritméticas dos grupos em pares de dados combinados (UPGMA). O coeficiente de similaridade de Jaccard (1901), a 2% de tolerância, foi utilizado para determinar a similaridade genética entre os grupos formados e observados no dendrograma.

2.6 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado na caracterização morfofisiológica foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial, trinta isolados, quatro meios de cultura: AV, BDA, EF e V8, três regimes de luz: claro contínuo, luz alternada (12h de luz e 12h de escuro), luz contínua e três temperaturas: 15, 25 e 35 °C com 12 repetições, constituindo uma área experimental de 12.960 placas de Petri, considerando uma placa de Petri como uma repetição.

Análise de variância dos isolados foi realizada para verificar diferenças no crescimento micelial e esporulação entre isolados nas diferentes condições do ambiente de cultivo, utilizadas através do teste F ($p \leq 0,05$). Nesse caso, as médias foram agrupadas para analisar os efeitos dos regimes de luz, temperaturas e meios de cultura e das interações entre estes sobre o crescimento micelial e a esporulação de *Alternaria alternata* patótipo tangerina. As médias gerais foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) e as demais pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares SISVAR® 5.3 (FERREIRA, 2010) e SAS/STAT® 9.3 (SAS Institute, 2011).

A diversidade genética nos trinta e oito isolados avaliados foi determinada com base na presença e ausência de fragmentos de DNA amplificados por três *primers* e visualizados nos géis de eletroforese obtidos nas análises. As imagens dos géis foram processadas no software BioNumerics® (Versão 7.1, Applied Maths, Bélgica) para agrupamentos dos isolados e análise de similaridade genética pelo coeficiente de Jaccard a 2% de tolerância. O dendrograma de similaridade foi obtido pelas médias aritméticas dos grupos formados em pares de dados combinados (UPGMA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização Morfofisiológica dos Isolados de *A. alternata* Patótipo Tangerina

3.1.1 Crescimento Micelial

Independente do local de coleta, todos os isolados apresentaram diferenças estatísticas em relação ao crescimento micelial. Verificaram-se que os isolados 6, 7, 8, 10, 11, 12 e 30 obtiveram os maiores crescimentos miceliais 7,63; 7,11; 7,35; 7,54; 7,29, 7,75 e 7,29 mm, respectivamente. Os isolados 5, 13, 23 e 26 apresentaram as menores médias 2,95; 2,97; 3,05 e 3,09 mm respectivamente. E os demais isolados apresentaram crescimento micelial medianos, visto que, houve diferença estatística quando comparados com os demais isolados e as respectivas localidades até o sétimo dia de avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento Micelial (CM) de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina. UFPB, Areia-PB, 2015.

Localidades	Isolados	CM (mm)
Lagoa Seca-PB	1	6,64 e
	2	7,20 b
	3	6,99 c
	4	6,81 d
	5	2,95 f
	6	7,63 a
Massaranduba-PB	7	7,11 a
	8	7,35 a
	9	7,29 b
	10	7,54 a
	11	7,29 a
	12	7,75 a
	13	2,97 f
	14	7,34 b
Matinhas-PB	15	6,66 e
	16	6,86 d
	17	6,55 e
	18	6,87 d
	19	6,89 d
	20	7,15 c
	21	6,95 d
	22	7,05 c
	23	3,05 f
	24	7,26 b
	25	6,76 d
	26	3,09 f
Pratânia-SP	27	4,49 e
	28	6,29 b
	29	6,92 d
Trás os Montes-PT	30	7,29 a

Médias seguidas pela mesma letra, independente da origem, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Todos os isolados, independente da condição do ambiente de cultivo utilizada foram estatisticamente diferentes em relação ao crescimento micelial. Analisando os isolados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 de *A. alternata* verificou-se que quando cultivados em escuro contínuo, luz alternada e luz contínua, a temperatura 25 °C e nos meios BDA e V8 apresentaram os maiores CM: 12,47; 12,44; 12,73 e 11,19; 10,12; 11,06 mm, em relação aos demais fatores até o sétimo dia de avaliação (Tabela 4).

Os isolados do 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 de *A. alternata* apresentaram-se maior CM quando utilizaram-se os regimes escuro contínuo, luz alternada e luz contínua, a 25 °C e cultivados nos meios BDA e V8 12,30; 12,27; 11,82 e 10,17; 10,38; 10,86 mm, respectivamente, em relação aos demais fatores avaliados até o sétimo dia de avaliação (Tabela 4).

Tabela 4. Crescimento Micelial (CM) de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina em função de diferentes condições de cultivo. UFPB, Areia-PB, 2015.

Localidades	Regimes de Luz	Temperaturas (°C)	Meios de cultura			
			AV	BDA	EF	V8
			CM (mm)			
Lagoa Seca- PB	Escuro contínuo	15	5,02 bBαβ	5,65 aBα	4,58 bBαβ	3,18 cCβ
		25	7,61 bAα	12,47 aAα	9,48 cAα	11,49 bα
		35	3,74 bCβ	4,98 aCβ	4,13 bBβ	4,09 bBβ
	Luz Alternada	15	5,91 aCα	5,87 aCβ	4,78 bCα	4,55 bCα
		25	9,82 bAβ	12,44 aAα	9,61 bAα	10,12 bα
		35	7,02 aBα	6,77 aBα	6,43 aCα	6,47 aBα
	Luz contínua	15	5,37 bBβ	6,87 aBβ	4,16 cBβ	4,79 bBα
		25	11,51 bAα	12,73 aAα	8,12 cAβ	11,06 bα
		35	3,94 abCβ	4,23 aCγ	2,86 cCγ	3,45 cCγ
Massaranduba- PB	Escuro contínuo	15	5,19 bCβ	6,22 aBαβ	4,13 cCα	4,89 bBα
		25	10,61 bAα	12,30 aAα	8,54 cAα	10,17 bα
		35	7,58 aBα	4,70 bCβ	5,25 bBβ	3,86 cCβ
	Luz Alternada	15	5,66 bCβ	6,25 aCα	4,13 cCα	4,53 cCβ
		25	9,60 bAα	12,27 aAα	8,71 dAα	10,38 cα
		35	6,26 bBβ	7,80 aBα	6,68 bBα	7,44 aBα
	Luz contínua	15	7,57 aBα	5,72 bBβ	4,38 cBα	5,49 bCβ
		25	9,90 bAα	11,82 aAα	9,05 dAα	10,86 cα
		35	5,62 bCγ	4,54 cCβ	4,85 cBβ	7,49 aBα
Matinhas-PB	Escuro contínuo	15	5,57 bCβ	6,34 aBβ	4,99 cBα	4,10 dCβ
		25	9,90 bAβ	11,07 aAβ	7,45 dAα	8,23 cAγ
		35	6,67 aBα	4,62 cCβ	4,40 cCβ	5,68 bBβ
	Luz Alternada	15	5,59 bCβ	6,64 aCα	4,46 dCβ	5,12 cCα
		25	10,23 bAα	10,73 aAβ	7,67 dAα	9,33 cAα
		35	6,20 bBβ	7,20 aBα	6,29 bBα	6,24 bBα
	Luz contínua	15	6,29 aCα	6,36 aBαβ	4,92 bBα	5,21 bBα
		25	10,17 bAαβ	10,68 aAα	7,42 dAα	10,90 bα
		35	6,65 aBα	4,31 bCγ	3,79 cCγ	4,22 bCγ

(Continuação)

Continuação						
Pratânia-SP	Escuro contínuo	15	7,10 aB α	5,86 bB β	2,37 d β	4,93 cC α
		25	12,02 aA α	10,37 bA β	6,45 b β	12,25 aA α
		35	6,58 aC α	2,87 dC χ	3,50 B χ	5,57 bB β
	Luz Alternada	15	5,45 aC β	5,23 aC χ	4,35 C α	4,69 bC α
		25	10,32 aA χ	10,30 aA β	8,90 b α	8,97 bA β
		35	6,59 bB α	8,08 aB α	6,63 B α	6,44 bB α
	Luz contínua	15	7,23 aB α	6,37 bB α	4,67 B α	5,07 cB α
		25	11,41 aA β	10,80 bA α	9,12 b α	9,50 cA α
		35	6,26 aC α	5,65 bC β	4,22 C β	4,72 cB χ
Trás dos Montes-PT	Escuro contínuo	15	6,74 aB α	6,60 aB α	4,10 B α	4,56 bB α
		25	10,65 aA α	10,97 aA α	5,78 B α	10,27 aA α
		35	6,29 aB α	2,61 bC χ	3,96 $\alpha\beta$	7,23 bA α
	Luz Alternada	15	5,59 aB $\alpha\beta$	4,30 abC β	2,92 B α	5,01 aB α
		25	8,71 aA β	10,39 aA α	5,67 B α	10,50 aA α
		35	6,51 aB α	7,82 aB α	4,28 B α	6,86 bA α
	Luz contínua	15	4,64 abB β	6,45 aB α	3,42 B α	5,30 abB α
		25	6,51 bcA β	10,63 aA α	5,98 B α	10,31 aA α
		35	7,45 bA α	4,84 aB β	2,50 B β	2,45 bC β

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Letra grega para regimes de luz, minúscula para meios de cultura e maiúscula para temperaturas.

O CM dos isolados 15 ao 26 de *A. alternata* foram maiores quando incubados em regime luz contínua, temperatura 25 °C e nos meios BDA e V8, apresentaram CM: 10,68 e 10,90 mm, em relação aos demais fatores até o sétimo dia de avaliação (Tabela 4).

O CM dos isolados 27, 28 e 29 foram maiores quando incubados em escuro contínuo a 25 °C, nos meios AV e V8, variaram de 12,02 a 12,25 mm de diâmetro (Tabela 4).

O isolado 30 obteve maior CM quando utilizou-se escuro contínuo, luz alternada e luz contínua a 25 °C em BDA, V8 e AV o CM variou de 10,27 a 10,97 mm (Tabela 4).

3.1.2 Esporulação

Independente da região coletada, os isolados avaliados foram estatisticamente diferentes em relação a esporulação. Verificou-se a maior produção de esporos de *A. alternata* quando utilizou-se os isolados 6, 7, 8, 10, 11, 12 e 30, observou-se 2,25; 2,18; 2,25; 2,40; 2,42, 2,53 e 2,68 x 10⁵ esporos/mL. Os isolados 1, 9 e 15, obtiveram as menores médias: 0,30, 0,35 e 0,13 x 10⁵ esporos/mL. E os demais isolados apresentaram uma produção mediana de esporos quando comparados os demais isolados e as respectivas localidades até o sétimo dia de avaliação (Tabela 5).

Tabela 5. Esporulação de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina. UFPB, Areia-PB, 2015.

Localidades	Isolados	Esporulação (10^5 esporos/mL)
Lagoa Seca-PB	1	0,30 f
	2	0,45 e
	3	0,45 e
	4	0,56 d
	5	1,05 c
	6	2,25 a
Massaranduba-PB	7	2,18 a
	8	2,25 a
	9	0,35 f
	10	2,40 a
	11	2,42 a
	12	2,53 a
	13	0,75 d
	14	0,76 d
Matinhas-PB	15	0,13 g
	16	0,39 e
	17	0,45 e
	18	0,48 e
	19	0,51 e
	20	0,60 d
	21	0,67 d
	22	0,89 c
	23	1,00 c
	24	1,02 c
Pratânia-SP	25	1,02 c
	26	1,15 c
	27	0,43 e
	28	0,65 d
	29	1,24 c
Trás os Montes-PT	30	2,68 a

Médias seguidas da mesma letra, independente da origem, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)

Analisando a esporulação dos isolados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 de *A. alternata* cultivados em função dos regimes de luz, temperaturas e meios de cultura, verificou-se maior esporulação quando utilizaram-se o regime escuro contínuo, a 25 °C em meio V8 produziu $3,09 \times 10^5$ esporos/mL. O mesmo regime, a 35 °C em meio EF produziu $2,30 \times 10^5$ esporos/mL. O regime de luz contínua com a temperatura 25 °C nos meios EF e V8 produziram $3,60$ e $1,65 \times 10^5$ esporos/mL, respectivamente. Estas condições de cultivo favorecem as maiores esporulações de *A. alternata* patótipo tangerina, em relação as demais condições do ambiente de cultivo utilizadas no sétimo dia de avaliação (Tabela 6).

A esporulação dos isolados 7 ao 14 foi maior quando utilizou-se escuro contínuo, a 25 °C em meio V8, produziram $1,69 \times 10^5$ esporos/mL. Em 35 °C, nos meios EF e V8, os isolados obtiveram $2,55$ e $2,15 \times 10^5$ esporos/mL, respectivamente. Luz contínua a 25 e 35 °C em meio

V8 estimulou os isolados a produzirem 1,78 e 1,65 x 10⁵ esporos/mL, respectivamente a cada temperatura (Tabela 6).

A esporulação dos isolados, 15 ao 26 foi maior quando utilizou-se escuro contínuo a 35 °C nos meios EF e V8, com 1,23 e 2,75 x 10⁵ esporos/mL, respectivamente. Luz contínua a 25 °C nos meios EF e V8 estimularam 3,83 e 2,19 x 10⁵ esporos/mL, respectivamente aos dois meios de cultura. Esses meios de cultura, nessas condições de luz e temperatura proporcionaram as maiores esporulações dos isolados de *A. alternata* patótipo tangerina avaliados (Tabela 6).

Tabela 6. Esporulação de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina em diferentes condições de cultivo. UFPB, Areia-PB, 2015.

Localidades	Regimes de Luz	Temperaturas (°C)	Meios de cultura			
			AV	BDA	EF	V8
			Esporulação (10 ⁵ esporos/mL)			
Lagoa Seca-PB	Escuro contínuo	15	0,02 bAβ	0,25 bBαβ	1,12 aAβ	1,78 aBα
		25	0,09 cAαβ	0,51 bAα	1,16 bAβ	3,09 aAα
		35	0 bAα	0,03 bBα	2,30 aAα	0,81 aCα
	Luz Alternada	15	0,72 bAα	0,51 cAβ	1,92 aAβ	0,65 bAβ
		25	0,38 bAα	0,004 cAβ	2,35 bcα	1,17 aAβ
		35	0,006 aBα	0,13 aBα	0,16 aBα	0,05 aBβ
	Luz contínua	15	0 cAβ	0,63 bAα	1,30 Bαβ	1,53 aAβ
		25	0,001 cAβ	0,12 cBβ	3,60 aAα	1,65 aAα
		35	0 bAα	0,005 bBα	0,69 aCα	0,05 bBβ
Massaranduba-PB	Escuro contínuo	15	0,41 cAβ	0,91 cAα	0,37 bAα	0,82 aBβ
		25	0,75 cAβ	0,41 cAα	0,69 bAα	1,69 aAα
		35	0,83 bAα	0,41 bAα	2,55 aAα	2,15 aAα
	Luz Alternada	15	0,13 bAβ	0,13 bAα	0,22 bAα	0,96 aBβ
		25	0,54 cAβ	0,41 cAα	0,32 bAβ	1,13 aAβ
		35	0,77 bAα	0 bAα	0 bBα	0,49 aBβ
	Luz contínua	15	0,65 bAα	0,15 cAα	0,46 bBα	9,16 aBχ
		25	0,50 cAα	0 dBα	1,37 bAα	1,78 aAα
		35	0 aBα	0 aBα	0,04 aCα	1,65 aAα
Matinhas-PB	Escuro contínuo	15	0,22 bBβ	0,03 bAβ	0,048 aBβ	0,06 aBβ
		25	0,16 cAβ	0,07 cAβ	0,089 bβ	0,01 aAβ
		35	0,09 bAα	0,002 cAα	1,23 aAα	2,75 aAα
	Luz Alternada	15	0,11 bBβ	0,12 bAβ	0,13 bAα	0,10 aBβ
		25	0,04 cAα	0,17 cAβ	0,14 bCα	0,10 bAα
		35	0,001 bBβ	0,01 bBα	0,02 bBα	0,08 aBβ
	Luz contínua	15	0,04 cAα	0,090 bAα	0,09 bBα	1,62 bAα

Continuação

		25	0,04 cAαβ	0,56 bAα	3,83 aAα	2,19 aAα
		35	0 bBβ	0,02 bBα	0,04 abCα	1,50 aBχ
Pratânia-SP	Escuro contínuo	15	0,13 bcAα	0 cAβ	0,55 bBα	1,36 aBβ
		25	0,11 cAα	0 cAβ	0,09 bAα	2,76 aAα
		35	0,05 bAα	0 bAα	1,56 aAα	1,42 aAα
	Luz Alternada	15	0,02 bAα	0,04 bBα	0,01 bAβ	1,23 aBβ
		25	0,23 cAα	1,51 bAα	0,04 cAβ	0,02 cAα
		35	0 bAα	0,28 bBα	0,14 abAα	0,42 aBβ
	Luz contínua	15	0,24 cAα	0,77 bAα	1,56 abAα	0 aBχ
		25	0,06 cAα	0,50 bAα	1,65 bAα	2,21 aAα
		35	0 aAα	0 aBα	0,01 aBα	2,22 aAα
Trás dos Montes-PT	Escuro contínuo	15	0,50 abBα	0,04 bBβ	0,06 bCα	1,06 aBα
		25	2,03 bAα	1,20 bAα	0,78 bBα	3,90 aAα
		35	0,27 bcAβ	0,85 bAα	5,35 aAα	3,06 bBβ
	Luz Alternada	15	0,35 bCα	0,35 bαβ	0,32 bAα	0,14 aBα
		25	1,47 aBα	0,84 Aαβ	0,82 bAα	1,23 aBβ
		35	1,28 bAα	0 dBβ	1,53 cAβ	0,71 bAα
	Luz contínua	15	0,75 abBα	0,97 bAα	0,35 bAα	1,60 bAα
		25	0,76 bBα	0,52 bAβ	1,38 bAα	3,50 aAα
		35	2,03 aAβ	0,80 bAα	0,25 bcAβ	0 cBχ

Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Letras gregas para regimes de luz, minúsculas para meios de cultura e maiúsculas para temperaturas.

Os isolados 27, 28 e 29 esporularam mais quando utilizou-se escuro contínuo a 25 °C em meio V8, produzindo $2,76 \times 10^5$ esporos/mL. A 35 °C, os meios EF e V8 estimularam $1,56$ e $1,42 \times 10^5$ esporos/mL, respectivamente aos meios de cultivo. Luz contínua a 25 e 35 °C em meio V8 estimularam $2,21$ e $2,22 \times 10^5$ esporos/mL, respectivamente a cada temperatura (Tabela 6).

O isolado 30 produziu maior número de esporos quando incubados em escuro contínuo a 25 °C em meio V8, abteve $3,90 \times 10^5$ esporos/mL. A 35 °C, em meio EF, produziu $5,35 \times 10^5$ esporos/mL. Luz contínua a 25 °C em meio V8 proporcionou a esporulação de $3,50 \times 10^5$ esporos/mL. Essas condições do ambiente de cultivo favoreceram as maiores esporulações do isolado de *A. alternata* patótipo tangerina em relação as demais condições de cultivos avaliadas no sétimo dia de avaliação (Tabela 6).

Não existe um consenso sobre o efeito da luz no mecanismo bioquímico da formação dos conidióforos de *Alternaria* spp. No entanto, para a esporulação os regimes de luz são importantes fatores, visto que, podem influenciar na esporulação em diversas espécies de

fungos fitopatogênicos como *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. e *A. solani* e *A. alternata* (ROTEM, 1998). No presente trabalho, escuro contínuo e luz contínua estimularam as maiores esporulações dos isolados de *A. alternata* patótipo tangerina avaliados. Assim, essas condições do ambiente de cultivo podem ser as ideais para a maior produção de esporos nesse patógeno.

A produção de esporos de *A. alternata* foi elevada em escuro prolongado (LUKENS, 1960), o que corrobora com o presente estudo e também com a pesquisa realizada por Aragaki (1962). O último autor afirmou que a fase terminal do ciclo da esporulação de diversas espécies fúngicas pode ocorrer no escuro contínuo, visto que, os ácidos nucléicos e as substâncias esporogênicas, que compõem os conídios permanecem por longos períodos na ausência de luz. Dessa forma, a esporulação é induzida nos fungos filamentosos. A luz, por um longo período de tempo também influencia na ativação de enzimas chaves (TRIONE; LEACH, 1969), responsáveis pela síntese de alguns compostos presentes nos meios que são essenciais à esporulação de várias espécies fúngicas (DEL PELOSO et al., 1989; CRUZ; PRESTES; MACIEL, 2009).

Com os resultados adquiridos e inferindo sobre o que ocorre em condições ambientais, isolados do patógeno nos campos de cultivos agrícolas podem esporular menos do que em meios de cultura, uma vez que, as tangerineiras estão submetidas aos fotoperíodos diurno e noturno e não em luz e escuros contínuos. Dessa forma, a esporulação dos isolados pode ter sido superestimada pelas condições do ambiente de cultivo utilizadas nas avaliações e isso favoreceu a elevada variabilidade observada.

Agentes físicos são capazes de induzir ou inibir o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo na maioria dos fungos, sendo a temperatura um dos mais importantes, pois modula a produção de proteínas e enzimas responsáveis pela manutenção da célula fúngica (GRIFFIN, 1994) além de influenciar na multiplicação celular. Verifica-se que nas temperaturas muito baixas, geralmente não há estímulo na produção de micélio e esporulação, pois observa-se diminuição no metabolismo do patógeno, já em temperaturas mais elevadas, ocorre decréscimo tanto nas taxas de crescimento micelial quanto na produção de esporos, pois, algumas enzimas essenciais podem desnaturar ou ter sua formação alterada, não retomando a atividade metabólica, o que pode reduzir drasticamente a esporulação (LEHNINGER, 2006).

De acordo com Pinheiro et al. (2012) cada espécie fúngica exige uma faixa de temperatura ideal para esporulação, podendo ser reduzida sob baixas temperaturas e aumentada à medida que a temperatura se eleva, até atingir um ponto máximo na esporulação. Inferindo sobre os resultados observados no presente trabalho, bem como observações na bibliografia

disponível. Entretanto, a temperatura nas faixas entre 25 a 35 °C são favoráveis aos altos índices de produção de esporos em diversas espécies de *Alternaria*.

Pode-se afirmar que o maior crescimento micelial de *A. alternata* patótipo tangerina obtido no presente trabalho ocorreu quando utilizaram-se os meios aveia-ágar (LEITE; AMORIM, 2002) e batata-dextrose-ágar (STRANDBERG, 1987) e V8 ágar, visto que, são meios de cultura que têm fontes de nitrogênio, fósforo, sais minerais e altos teores de açúcares em sua constituição (DHINGRA; SINCLAIR, 1985) elementos essenciais para que ocorra o aumento na produção de conidióforos. De acordo com Pulz (2007) essa fase há uma maior exigência por altas concentrações de açúcares, que por sua vez pode influenciar no aumento da produção vegetativa e reprodutiva observada em diversas espécies de *Alternaria*.

O meio V8 ágar influenciou na maior produção de esporos de *A. alternata* sendo este meio é composto por oito vegetais (tomate, beterraba, aipo, cenoura, alface, espinafre, salsa e agrião), rico em potássio, carboidratos complexos, minerais, fibras, vitaminas A, E, C e com apenas 0,3% de açúcar, visto que, são constituintes essenciais para obtenção dos maiores índices de esporulação em diversas espécies fúngicas (HANADA; GASPAROTTO; PEREIRA, 2002). O mesmo comportamento foi comprovado por Rotem (1998) quando afirmou que para ocorrer a esporulação de diversas espécies de *Alternaria*, necessariamente têm que apresentar em sua constituição, baixos teores de açúcares (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

O meio de cultura elaborado a partir de extratos de folhas de citros proporcionou alta produção de esporos de *A. alternata* patótipo tangerina, visto que as folhas contém em sua composição diversas substâncias como o cálcio, magnésio, zinco, fósforo e potássio que são essenciais na fase reprodutiva dos patótipos de *A. alternata*. E corrobora com estudos realizados por Satyanarayana; Sadasiva Reddy (1986) quando afirmaram que os meios de cultura preparados a partir espécies de plantas suscetíveis a determinados patógenos podem aumentar as taxas de esporulação. De acordo com Leão et al. (2012) em estudos de cultivo *in vitro* afirmaram que o meio EFM (extrato de folha de melancia), em regime de luz contínuo, favoreceram na maior produção de esporos de *Ascochyta cucumis* por mL em relação aos demais meios utilizados.

Pinheiro et al. (2012) quando utilizaram as temperaturas 15, 20, 25, 30 e 35 °C e o meio V8 ágar, verificaram que 25 °C influenciou nas maiores taxas de crescimento micelial e esporulação de *Alternaria porri* (Ell.) Cif., em relação as demais temperaturas avaliadas. O efeito das temperaturas 15, 20, 25, 30 e 35 °C, luz e escuro contínuo, meios V8, AV e BDA foram avaliados no crescimento e esporulaçãode *Alternaria dauci* (J.G. Kuhn) J.W. Groves &

Skolko (PULZ; MASSOLA JÚNIOR, 2009). Eles observaram que a condição de cultivo escuro contínuo, meio AV a 20 °C proporcionou maior crescimento micelial dos isolados avaliados.

Enquanto 25 °C em meio V8 influenciou nas maiores produções de esporos. Já para a *Alternaria solani* (Sorauer), ressaltaram que o meio V8, a 25 °C em escuro contínuo são condições mais favoráveis ao crescimento micelial e a esporulação desta espécie, quando comparado com outras condições de cultivo avaliadas. Semelhantemente ao observado no presente estudo, onde verificou-se que, no geral, a temperatura de 25 °C foi a mais estimulante ao crescimento micelial e esporulação dos isolados de *A. alternata* patótipo tangerina avaliados. Entretanto, o meio V8 a 25 °C é relatado como ideal às maiores taxas de crescimento micelial a 28 °C para esporulação de *A. alternata* (COLTURATO, 2006).

Avaliando vinte meios de cultura no crescimento micelial e a produção esporulação de *Alternaria brasiliensis* (Queiroz, Muniz & Menezes) a 25 °C e em escuro contínuo, verificaram-se que o meio V8, foi o mais eficiente, em relação aos demais meios avaliados (QUEIROZ; BATISTA; BROMMONSCHENKEL, 2004). Estudo desenvolvido por Griffin (1994) também observou que 25 °C foi favorável para produzir as maiores taxas de crescimento micelial e esporulação de *A. dauci* e *A. solani*. Corroborando com o observado no presente trabalho, onde os meios V8 e EF foram, no geral, os mais eficientes ao estímulo do crescimento micelial e da esporulação dos isolados de *A. alternata* patótipo tangerina avaliados.

3.2 Caracterização Molecular de Isolados de *A. alternata* Patótipo Tangerina

Foi observada uma elevada diversidade genética dentro de grupos de isolados apresentada pelos marcadores ISSR avaliados. A partir de, aproximadamente, 20 bandas polimórficas geradas foi possível, agrupar os isolados avaliados em três grupos com similaridade genética acima de 24% e um com 14,1%. O grupo 1 é formado pelos isolados 2, 3, 13, 15, 17, 24, 28, 29 e 33 provenientes de Lagoa Seca-PB, Massaranduba-PB, Matinhas-PB, Pratânia-SP e Remígio-PB. O grupo 2, formado pelos isolados, 6, 9, 18, 19, 21, 22, 26, 35, 37 e 38 são de Lagoa Seca-PB, Matinhas-PB e Remígio-PB. O grupo 3, compostos pelos isolados 1, 4, 5, 14, 16, 20, 23, 25, 27, 30, 31, 32, 34 e 36 provenientes de Lagoa Seca-PB, Massaranduba-PB, Matinhas-PB, Pratânia-PB, Trás os Montes-PT e Remígio-PB.

Grupos de similaridade e locais não estão relacionados no presente estudo, bem como não houve relação dos mesmos grupos com as características morfofisiológicas avaliadas, a não ser o grupo 4 de Massaranduba, PB. Apesar da elevada diversidade genética observada dentro de cada grupo, baixas similaridades genéticas, abaixo de 50% entre eles foram quantificadas, 24,1%; 36,3% e 47,6%, respectivamente. Esses resultados indicam diferenciação genética

elevada entre os grupos de isolados avaliados, mas semelhanças elevadas entre isolados dentro dos grupos, apesar da alta variabilidade observada (Figura 1).

Essa informação é relevante, uma vez que se tratam de grupos de isolados patótipo tangerina e isso consolida a informação de que todos os isolados de *A. alternata* de tangerinas avaliados são grupos genéticos muito próximos e com uma tendência de agrupamento por local ou agrupamento populacional (CARVALHO et al., 2011). Semelhantemente, houve uma tendência de agrupamento de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina por hospedeiro, observada por Dini-Andreote et al. (2009). Eles mostraram a formação de quatro grupos distintos utilizando marcadores AFLP e obtiveram um amplo perfil de análise por meio de marcadores AFLP. Não observaram nenhuma modificação significativa dentro dos grandes grupos obtidos quando comparados ao marcador RAPD também utilizado, exceto no posicionamento de três isolados.

Além disso, em ambas as análises, somente os isolados de plantas de limão agruparam entre si. Considerando outros hospedeiros ou tecidos de plantas, dentre eles tangerineiras, não foi possível encontrar grupos totalmente específicos a seus locais de coleta e hospedeiros.

Isolados oriundos de um mesmo Estado agruparam-se como os isolados de outro Estado ou até mesmo de outro País. Uma explicação provável para esses resultados é o fluxo gênico. Esses isolados podem ter sido levados a essas regiões via mudas, frutos ou sementes de tangerineiras. De acordo com Feichtenberger; Spósito (2004), *Alternaria alternata* pode ser transportado nessas condições, uma vez a necessidade de mudas sadias nos plantios. Caso este transporte esteja ocorrendo, isolados do patógeno podem ser levados de uma região para outra, ou até mesmo de uma país para outro e podem favorecer a “quebra” da resistência de variedades de tangerineiras onde estes isolados não estavam presentes (SOUZA et al., 2013).

Os isolados, 7, 8, 10, 11 e 12, provenientes da região de Massaranduba-PB (grupo 4) apresentaram alta diversidade genética em relação aos demais isolados (grupos 1, 2 e 3), com apenas 14,01% de similaridade. Isso pode indicar uma tendência de diferenciação genética entre os isolados que compõem esse grupo com os demais isolados (Figura 1). Marcadores morfofisiológicos desse grupo, tais como maior crescimento micelial (Tabela 3) e esporulação (Tabela 5), também os diferenciaram dos demais isolados avaliados.

Comportamento semelhante pode ser observado em outras populações de *Alternaria* spp. A variabilidade genética de populações de *A. solani* em tomateiro proveniente de diversas regiões brasileiras foi relativamente baixa com 26% de similaridade média entre 130 isolados avaliados. Essa variabilidade não relacionou-se as diversas áreas analisadas (LOURENÇO JÚNIOR, 2008). Similarmente, baixa variação genética em uma população de *A. alternata* com

271 isolados foi observada por Adachi et al. (1993), em populações de isolados provenientes de várias regiões produtoras no Japão.

Uma explicação provável é a deriva genética. Populações de isolados podem surgir a partir de pequenos grupos que evoluíram, se estabeleceram ou estão em processo de estabelecimento, em resposta a determinados genótipos de hospedeiros ou outras pressões seletivas do ambiente, que são comuns a cada região ou o patógeno. Inferindo-se com essas observações do presente trabalho, é possível que esse grupo de isolados de *A. alternata* patótipo tangerina estejam evoluindo e em um futuro próximo, o que provavelmente tornará uma população ou até mesmo linhagem geneticamente distinta dos isolados agrupados.

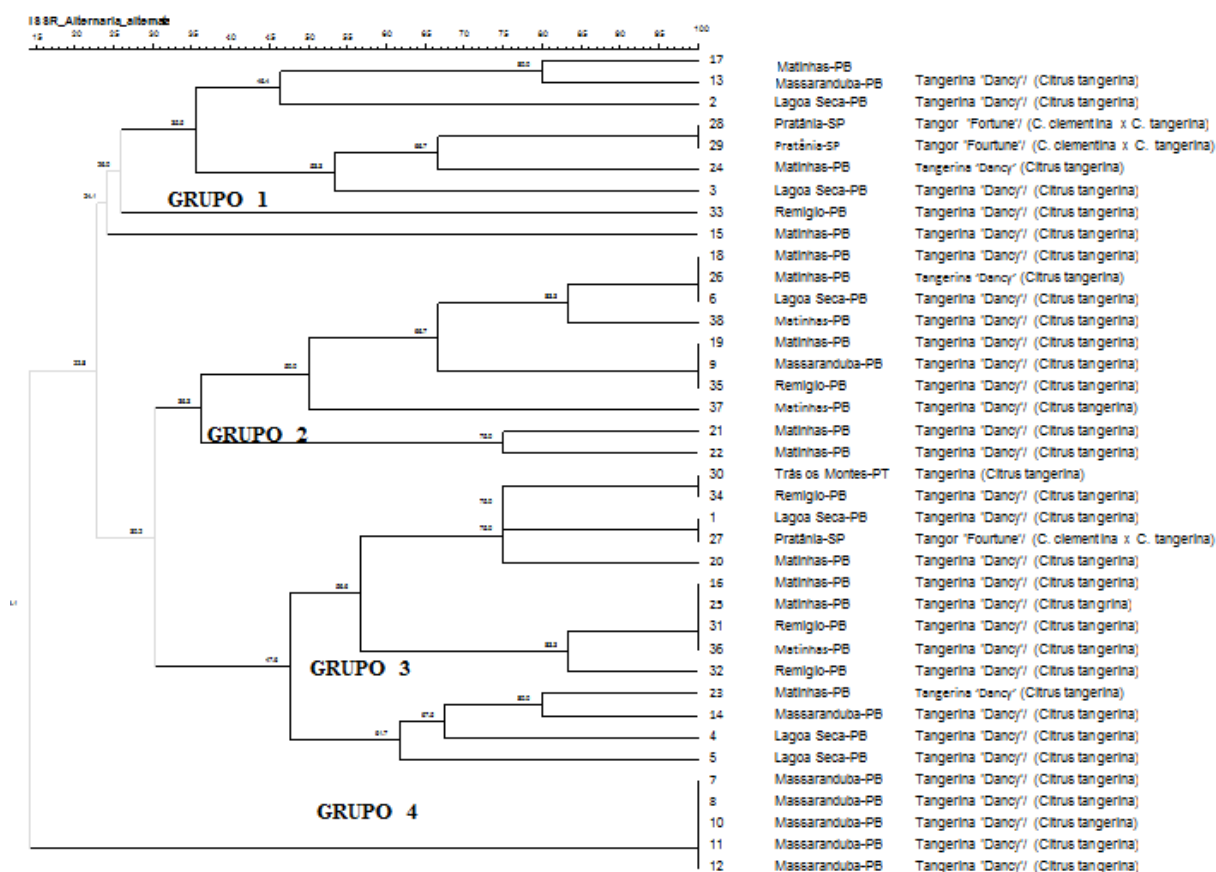


Figura 1. Dendrograma com trinta e oito isolados de *A. alternata* patótipo tangerina coletados em diferentes localidades, agrupados de acordo com estimativas de similaridade genética obtidas pelas bandas polimórficas geradas pelo método ISSR (UPGMA). UFPB, Areia-PB, 2015.

A elevada variabilidade de microrganismos não é ocasionada unicamente por pressões do ambiente decorrentes de diferenças de hospedeiro ou geográficas, mas também pode ser influenciada por algum fator intrínseco do hospedeiro ou do patógeno, como em fungos assexuados e dentre eles *A. alternata* patótipo tangerina, por ser um patógeno com reprodução sexuada rara ou não observada na natureza (DINI-ANDREOTE et al., 2009), verifica-se a

prevalência de mecanismos de recombinação genética tais como, parasexualidade e paramiose que podem ter influenciado na elevada variabilidade genética detectada no presente trabalho.

Algumas pesquisas observaram resultados similares ao presente trabalho ao utilizarem marcadores RAPD, em isolados de *A. brassicicola* (MICHEREFF et al., 2003) onde foi observada elevada variabilidade genética entre isolados, além de comprovarem variabilidade quanto ao crescimento micelial e esporulação.

A variabilidade morfológica e fisiológica em isolados de *A. solani* foi observada por Oliveira (2007). Verificou-se que esse isolados apresentaram ampla variabilidade genética entre os isolados e que não houve correlação entre o índice de crescimento micelial e a taxa de esporulação e nem com a origem geográfica dos mesmos.

A diversidade de genótipos de *A. solani* em quatro regiões na China, utilizando ISSR foi realizada por Meng et al. (2015). Eles verificaram que 268 isolados apresentaram alta variação genética dentro das populações de um mesmo local e não observou diferenças genéticas entre locais de coleta, quando avaliaram a diversidade genética entre 45 isolados *A. alternata* associados aos *Citrus* spp. no sul do Irã por RAPD-PCR, Ghasemloee; Niazmand (2014), observaram consistência e elevada diversidade genética em apenas 13 isolados de *A. alternata*. Os outros 32 isolados de *A. alternata* não mostraram elevadas divergências genéticas.

A diversidade de isolados de *Alternaria brassicicola* (Schwein) Wiltshire, em várias regiões da Índia por meio de marcadores ISSR (DEEP et al., 2014), evidenciou elevado nível de polimorfismo entre os isolados. Quando foram correlacionados entre os grupos, verificou-se similaridade média de 0,53. Os isolados CaAbcP1 e CaAbcWB3 foram 0,85 similares. Enquanto os isolados CaAbcK1 e CaAbcH1 foram mais distante com 0,22. Apesar das distancias encontradas, pôde-se afirmar que só foram detectadas dentro dos próprios grupos, mas não apresentaram diferenças genéticas em relação às diversas regiões coletadas.

4 CONCLUSÕES

- ✓ Os isolados de *A. alternata* patótipo tangerina coletados em Massaranduba-PB apresentaram alto crescimento micelial, esporulação e alta diversidade genética em relação aos demais isolados avaliados;
- ✓ De forma geral, o regime de luz contínuo, a 25 °C nos meios BDA e V8 foram os ideais para o crescimento micelial e esporulação dos isolados avaliados *A. alternata* patótipo tangerina, no entanto, escuro contínuo em meio AV foi melhor aos isolados de Pratânia-SP até o sétimo dia de avaliação;
- ✓ Todos os isolados apresentaram alta diversidade genética entre eles e ocorreu uma tendência de agrupamento por local demonstrada através dos marcadores morfofisiológicos e moleculares avaliados.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, Y.; WATANABE, H.; TABABE, K.; DOKE, N.; NISHIMURA, S.; TSUGE, T. Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variability in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n.59, p.3197-3205, 1993.
- ARAGAKI, M. Quality of radiation inhibitory to sporulation of *Alternaria tomato*. **Phytopathology**, St. Paul, v.52, p.1227, 1962.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. 2. Ed. Goiânia, GO: Editora da UFG. 2008. 536p.
- CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola Tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, p.429-433, 1999.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, n.42, 225p. 1939.
- CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; CAMARGOS, R. B.; OLIVEIRA, D.F.; SCOLFORO, J.R.S.; CARVALHO, D.A. de; BATISTA, T.R.S. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micología**, Malden, v. 28, n. 4, p.173–178, 2011.
- COLTURATO, A.B. **Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. citri, causador da mancha marrom do tangor murcote**. 2006. 53F. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências agrônômicas, São Paulo-SP. 2006.
- COSTA, R.V.; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; SILVA, D.D.; GUIMARÃES, P.E.; GUIMARÃES, L.J.M.; PARENTONI, S.N.; PACHECO, C.A.P. Desenvolvimento de metodologia para inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, (**Circular Técnica, 139**). 6p. 2010.

CRUZ, M.F.A.; PRESTES, A.M.; MACIEL, J.L.N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.39, n. 5, p.1562-1564, 2009.

DEEP, S.; SHARMA, P.; BEHERA, N.; CHOWDAPPA, P. Diversity in Indian Isolates of *Alternaria brassicicola* (Schwein) Wiltshire Causing Black Leaf Spot Disease in Cauliflower. **Plant Pathology Journal**, St. Paul, n.13, p.232-245, 2014.

DEL PELOSO, M.C., FERNANDES, C.D., FILGUEIRAS, A.T.; CHAVES, G.M. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, n.14, p.41-44, 1989.

DINI-ANDREOTE, F.; PIETROBON, V.C.; DINI-ANDREOTE, F.; ROMÃO, A.S.; SPÓSITO, M.B.; ARAÚJO, W.L. Genetic variability of brazilian isolates of *Alternaria alternata* detected by aflp and rapd techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo-SP, v.40, p.670-677, 2009.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. Doenças dos citros: manejo integrado. **Visão Agrícola**, São Paulo-SP, v.2, p.44-47, 2004.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras-MG, v.6, p.36-41, 2008.

GHASEMLOEE, M.; NIAZMAND, A.R. Genetic Diversity of *Alternaria alternata* Associated with Citrus spp. in Southern Iran Based on RAPD- PCR, **Journal of Pure and Applied Microbiology**, India, v.9, n.1, p.10-12, 2014.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2ed. New York: Willey-Liss, 1994. 456p.

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, n.27, p.170-173, 2002.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, Madri, v.37, p.547-579, 1901.

LEÃO, E.U.; SANTOS, G.R. dos; SARMENTO, R.A.; REIS, M.R. dos; CHAGAS JÚNIOR, A.F. Crescimento micelial e produção de conídios de *Ascochyta cucumis* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Bioscience Journal**, Uberlândia-MG, v.28, n.2, p.325-331, 2012.

LEITE, R.M.V.B.; AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo da mancha de *Alternaria* em girassol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.27, n.2, p.193-200, 2002.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 4 ed: São Paulo. Sarvier, 2006.

LOURENÇO JÚNIOR, V. **Molecular population genetics of *Alternaria solani* in Brazil**. 2008. 140f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2008.

LUKENS, R.J. Conidial production from filter paper cultures of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.50, p.867-868, 1960.

MENG, J.W.; ZHU, W.; HE, M.H.; WU, E.J.; YANG, L.N.; SHANG, L.P.; ZHAN, J. High genotype diversity and lack of isolation by distance in the *Alternaria solani* populations from China, **Plant Pathology**, St. Paul, v.64, p.434-441, 2015.

MICHEREFF, S.J.; NORONHA, M.A.; ROCHA JR., O.M.; SILVA, J.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.28, p.656-663, 2003.

OLIVEIRA, M. da S. **Diversidade de isolados de *Alternaria solani*: avaliação morfológica, fisiológica e molecular**. 2007. 99f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 2007.

PINHEIRO, G.S.; ANGELOTTI, F.; COSTA, N.D.; SANTANA, C.V. da S.; RODRIGUES, D.R. Impacto de alterações da temperatura sobre o crescimento e esporulação de *Alternaria porri*. **52º Congresso Brasileiro de Olericultura**. 2p. 2012.

PULZ, P.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu-SP, v.35, n.2, p.121-126, 2009.

PULZ, P. **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* em meio de cultura**. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado). Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo-SP. 2007.

QUEIROZ, F.M.; BATISTA, U.G.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de *Alternaria brasiliensis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.29, p.541-543, 2004.

RAEDER, V.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v.1, n.1, p.17-20, 1987.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and patogenicity**. St Paul. APS Press. 1998. 326p.

SALGADO, A.P.S.P.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J.A.; ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolares sorokiniana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v.27, p.249-254, 2003.

SANTOS, D. **Educação, Biologia e afins**, 2015. Disponível em: <<https://djalmasantos.wordpress.com/page/7/>>. Acesso em: 15 Abr. 2016.

SAS Institute. 2011. **SAS/STAT®** Versão 9.3: User's guide. SAS Institute Inc., 2011. 8621p.

SATYANARAYANA, K.; SADASIVA REDDY, C. A new and cheap medium supporting the sporulation of *Pyricularia oryzae*. **Indian Journal Mycological Plant Pathology**, India, v.163, n.3, p.329-330, 1986.

SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas-SP, v.17, n.3, p.495-503, 2015.

SOUZA, B.O.; CASELA, C.R.; NUNES, J.A.; CASTRO, H.A. Management of sorghum anthracnose through diversification of genetic resistance in host population. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa-MG, v.38, n.1, p.020-027. 2013.

STRANDBERG, J.O. Spore production and dispersal of *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.1262-1266, 1987.

TOFOLI, J.G.; MELO, P.C.T.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T. Potato late blight and early blight: importancy, characteristics and sustainable management. **Biológico**, São Paulo-SP, v.75, n.1, p.33-40, 2013.

TRIONE, E.J.; LEACH, C.M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, p.1077-1083, 1969.

WAALS, J.E.VAN der; KORSTEN, L.; SLIPPERS, B. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, p.959-964, 2004.

ALTERNATIVAS NO CONTROLE DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA ‘DANCY’ (*Citrus tangerina*)

Andréa Celina Ferreira Demartelaere¹; Luciana Cordeiro do Nascimento¹;

¹Laboratório de Fitopatologia, PPGA/CCA/UFPB;

Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Rodovia PB 079, Km 12 CEP 58397-000, Areia - PB, e-mails:

andrea_celina@hotmail.com, lucianacordeiro@cca.ufpb.br

RESUMO– A tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka) apresenta características pós-colheita desejáveis como cor, aroma, sabor e ampla aceitação pelo mercado consumidor. Trata-se de uma variedade bastante produzida no estado da Paraíba, porém, suscetível a MMA, causada pelo fungo *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri* responsável por comprometer a qualidade dos frutos. O uso de produtos alternativos para controle de doenças em pós-colheita visa à proteção de frutos através dos mecanismos de defesa que induzem resistência. Portanto, objetivo do trabalho foi determinar o potencial do extrato de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* (Benth.) Ducke, Quitosana[®] e do fungo *Trichoderma asperellum* em respostas de defesa em frutos no manejo da MMA e manutenção da pós-colheita. Os experimentos foram realizados no LAFIT e LAPOA/UFPB/CCA, Areia-PB. Os frutos foram desinfestados e imersos em extrato de *C. ferrea* nas concentrações 0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL, Quitosana[®] a 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L. e *T. asperellum* a 10¹⁰ esporos/mL. Após 24 h da aplicação dos tratamentos, foi inoculado *A. alternata* (10⁵ esporos/mL). No segundo dia após a inoculação (DAI), foram realizadas diariamente as avaliações da e pós-colheita e severidade até atingir a última escala de notas que se deu no décimo segundo dia. Para as análises das atividades da fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase foram retiradas três frutos/repetição no primeiro e no décimo segundo dia do experimento. O delineamento foi em DIC com 10 tratamentos (0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*), (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L da Quitosana), (10¹⁰ esporos/mL de *T. asperellum*) e cinco repetições, constituindo uma unidade experimental com 250 frutos. Foi realizada análise de regressão e o teste de Dunnett ($P \leq 0,05$) no programa SAS[®] System 9.3. As concentrações 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea*, 1,5 g/L de Quitosana[®] e *T. asperellum* reduziram a severidade da MMA, promoveram alta atividade das enzimas fenil alanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase e em todos os tratamentos mantiveram a qualidade pós-colheita em frutos de tangerineira ‘Dancy’.

Palavras-chave: *Caesalpinia ferrea*, Citros, Quitosana[®], *Trichoderma asperellum*

ALTERNATIVES IN THE CONTROL OF ALTERNARIA BROWN SPOT IN TANGERINE 'DANCY' (*Citrus tangerine*)

ABSTRACT- The tangerine 'Dancy' (*Citrus tangerine* hort. Ex Tanaka) has desirable post-harvest characteristics such as color, aroma, flavor, and widely accepted by the market. This is quite a variety produced in the state of Paraíba, however, susceptible to Alternaria brown spot (MMA), caused by the fungus *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri* responsible for compromising fruit quality. The use of alternative products to control disease in post-harvest fruits aims at protection through defense mechanisms that induce resistance. Therefore, objective of this study was to determine the potential of ironwood (*Caesalpinia ferrea* (Benth.) Ducke extract, Chitosan[®] and *Trichoderma asperellum* in defense responses in fruit tangerine 'Dancy' in the management of Alternaria brown spot and maintenance of postharvest. The experiments were performed at LAFIT in LAPOA/UFPB/CCA, Areia-PB. Tangerine fruits 'Dancy' were disinfected and immersed in *C. ferrea* extract at concentrations of 0; 10; 100; 500 and 1000 µg/mL, Chitosan[®] 0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 g/L and *T. asperellum* to 10¹⁰ spores/mL. 24 h after the application of the treatments was inoculated *A. alternata* (10⁵ spores/mL) in fruits. On the second day after inoculation (DAI) were performed daily for severity ratings until the last grading scale that occurred on the twelfth day. For the analysis of the activities of phenylalanine ammonia lyase, peroxidase and polyphenol oxidase were taken three fruits/repeat in the first and twelfth day after treatment application. The design was completely randomized with 10 treatments (0, 10, 100, 500 and 1000 µg/mL of *C. ferrea* extract), (0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 g/L of Chitosan[®]) (10¹⁰ spores/mL *T. asperellum*) and five replicates of five fruits, constituting an experimental unit with 250 fruit. Regression analysis was performed and Dunnett's test ($P \leq 0.05$) in SAS[®] System 9.3. The concentrations of 500 µg/mL *C. ferrea* extract, 1,5 g/L Chitosan[®] and *T. asperellum* reduced the severity of MMA promoted high activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase and all treatments kept the postharvest quality in fruits of tangerine 'Dancy'.

Key words: *Caesalpinia ferrea*, Chitosan[®], Citrus, *Trichoderma asperellum*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de frutas cítricas no mundo, apresentando uma produção nacional de laranjas e tangerinas com aproximadamente 19.811.064 toneladas e 1.004.727 toneladas, respectivamente, na safra de 2014 (IBGE, 2015). Essa produção resulta principalmente pela aceitação e demanda do consumidor, devido ao sabor, valor nutritivo, formas de consumo (*in natura*, sucos, licores, doces, etc.), facilidade de industrialização e relativa resistência a danos resultantes da manipulação pós-colheita (CITRICULTURA, 2013).

Na última década, o cultivo de citros expandiu da região Sudoeste, para as regiões Sul e Nordeste, ampliando cada vez mais a produção (CITRUS BR, 2013). No Nordeste, o estado da Bahia se destacou com uma crescente produção em torno de 500 mil toneladas (AGRONEGÓCIOS, 2014). No estado da Paraíba, o principal Pólo citrícola concentram-se em sete municípios: Lagoa Seca (latitude 7° 10' 15" S, longitude 35° 51' 14" W), Remígio (latitude 6° 54' 10" S, longitude 35° 50' 2" W), Esperança (latitude 7° 1' 22" S, longitude 35° 51' 36" W), São Sebastião de Lagoa de Roça (latitude 7° 4' 58" S, longitude 35° 50' 6" W), Alagoa Nova (latitude 7° 4' 15" S, longitude 35° 45' 28" W), Massaranduba (latitude 7° 12' 0" S, longitude 35° 47' 20" W) e Matinhas (latitude 7° 7' 30" S, longitude 35° 46' 1" W), apresentando uma produção em torno de 20 mil toneladas na safra de 2014 (IBGE, 2015).

A tangerineira tipo 'Dancy' (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka) apresenta características pós-colheita desejáveis e com ampla aceitação pelo mercado consumidor, por apresentar frutos, suculentos, aromáticos, sabor agradável, fáceis de serem descascados e ricos em sais minerais, lipídeos, pectinas, vitaminas e açúcares (FATTA DEL BOSCO et al., 2007). Essa variedade é bastante produzida no Estado da Paraíba, porém, suscetível a mancha marrom de alternaria (MMA), doença de grande importância econômica causada pelo fungo *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri* (SPÓSITO et al., 2003).

Esse patógeno pode causar lesões de tamanho bastante variável, atingindo grandes áreas da casca e chegando até a polpa, provocando cicatrizes que depreciam o fruto, podendo ser facilmente destacados pela planta, comprometendo a produtividade, qualidade e inviabilizando a comercialização dos frutos para o consumo *in natura* (COTTAS, 2011).

O uso excessivo de fungicida no combate aos danos provocados pelo fungo, tem provocado o acúmulo de produtos químicos nos frutos e onerando os custos de produção. Por isso, tem-se reduzido e ou substituído o uso de agrotóxicos por produtos alternativos, visando à proteção de frutos através da utilização de elicitores bióticos ou abióticos capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento de fitopatógenos e responsáveis por manter da qualidade dos frutos

(SILVA et al., 2011), reduzindo os impactos ambientais, sem causar danos ao homem e ao ambiente (SILVA et al., 2014)

A espécie nativa do semiárido brasileiro, conhecida popularmente como pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* (Benth.) Ducke) pertencente à família Fabaceae e está presente em diversos biomas como a caatinga, mata seca e nos brejos de altitude, com ocorrência desde o Estado do Piauí até a Paraíba (LORENZI, 2000) e tem sido estudada devido o alto potencial no manejo de doenças, por apresentar propriedades antimicrobianas presentes no extrato, que pode ser feito de várias partes da planta (folhas, frutos e caule), mensuradas através de compostos associados as substâncias responsáveis pela construção de componentes das paredes celulares e também pela síntese de proteínas, vitaminas, hormônios e enzimas (PINTO, 2013) como as polifenoloxidase, peroxidase e a fenilalanina amônia-liase que são responsáveis pela formação de compostos fenólicos nas plantas, ativando os mecanismos de defesa (mecanismo indireto), induzindo resistência como também a ação fungitóxica (mecanismo direto) (STANGARLIN et al., 2011).

Outro método alternativo bastante utilizado na pós-colheita é a Quitosana[®] um polímero atóxico e biodegradável, encontrado naturalmente no exoesqueleto de crustáceos (DASH et al., 2011) e tem sido bastante difundido por biofilme incolor, comestível e de consistência gelatinosa, que protege a superfície externa dos frutos, responsável pelo engrossamento da parede celular dos tecidos dos hospedeiros, formando papilas que ocupam espaço intracelular com substâncias amórficas e que podem induzir respostas de defesa (COSTA et al., 2012).

O gênero fúngico *Trichoderma* spp. é bastante eficiente no controle biológico de doenças, atuando em diversos mecanismos de defesa, podendo induzir resistência através da ação indireta, provocando alterações morfológicas e bioquímicas no vegetal (LUCON et al., 2010) ou através da ação direta, com a produção de diversas substâncias tóxicas, voláteis, não voláteis e com amplo espectro na atividade antimicrobiana.

Face ao exposto, objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial do extrato de pau-ferro, Quitosana[®] e o fungo *Trichoderma asperellum* em resposta da defesa em frutos de tangerineira ‘Dancy’ no manejo da mancha marrom de alternaria e manutenção da pós-colheita.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do Experimento

A preparação do extrato de *C. ferrea* foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Campus-I, João Pessoa-PB. O preparo do inóculo e a inoculação de *A. alternata* patótipo tangerina, as diluições do extrato de *C. ferrea*, Quitosana®, antagonista *T. asperellum* e as análises pós-colheita foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais. E as análises das atividades enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Origem de Produtos Naturais, do Departamento de Zootecnia, no Centro de Ciências Agrárias-UFPB, Campus II, Areia-PB.

2.2 Aquisição dos Frutos de Tangerineira ‘Dancy’

Os frutos de tangerineira ‘Dancy’ foram adquiridos em pomar comercial na cidade de Remígio-PB (6° 54' 10" S e 35° 50' 2" W), colhidos no estágio E2 (estágio de maturação intermediário, onde os frutos apresentavam coloração da casca amarelo esverdeada) de acordo com a classificação descrita pelo IAC/CEAGESP (2000).

Em seguida, foram levados ao Laboratório de Fitopatologia, onde foi feita a desinfestação dos frutos em recipientes de polietileno (capacidade 20 L), iniciando com mergulho em detergente líquido a 2%, posteriormente foi feita a imersão dos frutos em hipoclorito de sódio a 5%, sendo ambos os processos realizados durante o período de cinco minutos, e posteriormente postos para secar em papel toalha à temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

2.3 Preparo dos Produtos Alternativos e Aplicação nos Frutos

2.3.1 Extrato de Pau-ferro

Folhas de pau-ferro foram coletadas na Área Experimental da Chã de Jardim, do CCA, Campus II, Areia-PB (6° 57' 42" Sul e 35° 41' 43" Oeste) e postas dentro de sacos de papel, levadas à estufa com temperatura constante de 60 °C por um período de 72 h até a obtenção da massa seca.

Posteriormente, as folhas foram trituradas em moinho de facas para a obtenção do pó, pesadas 100 g e colocadas em recipientes de vidro à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) com adição de 200 mL de etanol (96%), agitadas duas vezes ao dia, por um período de 72 horas em infusão (LIMA et al., 2010).

Em seguida, filtrou-se o líquido e por meio de evaporador rotativo com temperatura de 40 °C foi removido o etanol, e desta forma foi obtido o extrato bruto etanólico (CARRERA et al., 2014) que foi diluído em água destilada esterilizada (ADE) com agitador magnético, por um período de duas horas, para obtenção das seguintes concentrações 0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL.

2.3.2 Quitosana®

A solução de Quitosana® de médio peso molecular (Qmpm; 190-310 KDa), adquirida junto à empresa Sigma-Aldrich Chemicals, SP, Brasil foi preparada de acordo com a metodologia de Cia et al. (2010), solubilizando-se o polissacarídeo em ácido acético a 1% em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), seguido de agitação constante por um período de duas horas, para permitir a completa dissolução do produto. Em seguida, foram feitas as diluições nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L com 75-85% de desacetilação.

2.3.3 *Trichoderma asperellum*

Foi feita a diluição 10^{10} esporos/mL de *T. asperellum* do produto Quality® adquiridos junto ao Laboratório Farroupilha de Produtos Biológicos, Patos de Minas-MG.

Para cada concentração dos tratamentos descritos, foram utilizados recipientes individuais com capacidade para 20 L, onde os frutos de tangerineira ‘Dancy’ foram mergulhados durante cinco minutos e colocados em bandejas de poliestireno expandido para secar a temperatura (25 ± 2 °C) sendo acondicionados em câmara úmida, confeccionada com sacos de polietileno transparentes, vedados na extremidade, por um período de 24 horas.

2.4 Preparo do Inóculo e Inoculação de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* em Frutos

O isolado proveniente de Portugal (Trás os Montes) foi obtido de frutos de tangerineira (*C. tangerina*) com sintomas típicos da MMA. Através de testes de inoculação realizado em frutos de Tangerineira ‘Dancy’ (*C. tangerina*), o mesmo mostrou-se virulento.

O material coletado foi desinfestado por meio de lavagens sequenciais com etanol a 70% por trinta segundos, hipoclorito a 1% durante três minutos e duas imersões com água destilada esterilizada (ADE). Três fragmentos com 5 mm de diâmetro foram postos em meio de cultura BDA (200 g batata, 20 g dextrose, 20 g ágar L⁻¹) e acrescido do fungicida Carbendazin na dose de 50 mL/100 L, para inibir a proliferação de fungos contaminantes no meio de cultura.

As placas contendo o fungo foram incubadas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (COLTURATO, 2006). Para confirmar a identidade do isolado, três discos de 5 mm de diâmetro com as colônias fúngicas foram transferidas para o meio acrescido de carbonato de cálcio (30

g de CaCO₃, 20 g de sacarose e 20 g de ágar L⁻¹) para indução de esporulação de *A. alternata* e mantidos em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999).

Após sete dias de cultivo, observou-se a pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas *in vitro*. Para a análise em microscópio óptico foram preparados esfregaços em lâminas de microscopia, que foram coradas com azul de metileno. A identificação foi realizada observando-se estruturas como micélio e esporos (ROTEM, 1998).

Em seguida, foi adicionada na superfície da placa de Petri 10 mL de ADE e, com auxílio de uma espátula estéril, os esporos de *A. alternata* foram raspados, filtrados em dupla camada de gaze esterilizada e quantificados em hemocitômetro e ajustadas na concentração 10⁵ esporos/mL.

Após 24 horas da incubação dos frutos em câmara úmida, foram feitos os quatro ferimentos de 0,3 mm de profundidade com o auxílio de um perfurador flambado em dois pontos equidistantes na região equatorial dos frutos (DENARDI; BERTON; SPENGLER, 2003) em seguida, foi realizada a inoculação com 0,125 µL da suspensão em frutos de tangerineira ‘Dancy’ com ajuda de um pipetador de 10 µL, nas duas regiões onde foram provocadas as lesões.

2.5 Avaliação da Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD)

No segundo dia após a inoculação (DAI), foram realizadas diariamente as avaliações da severidade em frutos de tangerineira ‘Dancy’ até atingir a última escala de notas que se deu no décimo segundo dia, mediante emprego de escala diagramática descrita por Renaud et al. (2004) (Figura 1).



Figura 1. Escala diagramática descrita por Renaud et al. (2004) para avaliação da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*). UFPB, Areia-PB, 2015.

Com os dados da severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença, conforme a fórmula descrita por Shaner; Finney (1977), $AACPD = \sum [(y_1 + y_2) / 2 * (t_2 - t_1)]$, onde y_1 e y_2 são as percentagens de área lesionada nos frutos observada nas avaliações e t_{i+1} - t_i , são os intervalos entre as avaliações. O ponto de máxima eficiência técnica para AACPD foi encontrada de acordo com Storck et al. (2011).

A proteção dos frutos foi calculada através da área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) de cada tratamento, em que a % Proteção = $(AACPD \text{ Tratamentos} \times 100 / AACPD \text{ Testemunha})$ descrita por Del Rovere (2013).

2.6 Avaliação da Atividade Enzimática

No início e no final do experimento (décimo segundo dia), foram retirados das bandejas de polipropileno, três frutos de tangerineira ‘Dancy’ de cada repetição, totalizando 75 frutos de todos os tratamentos para a quantificação das proteínas, obtidas a partir de 3,0 g de casca dos frutos, foram maceradas em almofariz com 15 mL de tampão de acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, (pH 5,2), com 0,07 g de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP).

A mistura foi filtrada em tecido de trama fina e a suspensão centrifugada a 14.000 g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para microtubos de 2 mL e mantido a -80°C até o momento das análises. As proteínas solúveis contidas nos extratos foram aferidas pelo ensaio de Bradford (1976).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. E o ponto de máxima eficiência técnica das atividades enzimáticas foram encontrados de acordo com Storck et al. (2011).

2.6.1 Proteínas Totais

As proteínas solúveis contidas nos extratos foram aferidas pelo ensaio de Bradford (1976), através da curva padrão, onde foram adicionados 100 µL de uma solução de BSA (µg/µL) e a partir dessa solução, foram feitas as diluições seriadas em água ADE para a obtenção das demais concentrações (0 µg/µL; 2 µg/µL; 4 µg/µL; 6 µg/µL; 8 µg/µL e 10 µg/µL). Em seguida, a preparação do branco, através da adição em um tubo de microcentrífuga 50 µL água ADE e 100 µL de Bradford. Para o preparo da amostra, foi adicionando em um tubo de microcentrífuga 50 µL do extrato e 1000 µL de Bradford.

As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min e medida a absorbância em comprimento de onda 595 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína.

2.6.2 Atividade da Fenilalanina Amônia-liase (FAL)

Determinada pela quantificação do ácido trans-cinâmico liberado a partir da fenilalanina (UMESHA, 2006). Para isso, foi adicionado 250 µL de extrato, 1500 µL de tampão Tris-HCl (100 mM) (pH 8,8), 500 µL de fenilalanina (100 mM) e 750 µL de ADE, incubado a 40 °C por 60 min. A reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido clorídrico (5,0 M).

A leitura foi realizada em cubeta de quartzo no espectrofotômetro (Lightwave II, WPA, Biochron) por meio de variação na absorbância em comprimento de onda 290 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína.

2.6.3 Atividade da Peroxidase (POD)

Determinada através da reação que consistiu na adição de 750 µL do tampão de reação (tampão fosfato de sódio (100 mM)) (pH 6,0), 250 µL de guaiacol (1,7%), 250 µL (H₂O₂) e 250 µL composto por: 150 µL de água + 100 µL do extrato, onde o guaiacol peroxidase converteu o guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi paralisada com a adição de 800 µL de ácido perclórico (2,0 M) e monitorada por um período de dois min e, a cada 15 segundos foram realizadas leituras para verificar a atividade da enzima peroxidase com comprimento de onda de 470 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína (RONCATO; PASCHOLATI, 1998).

2.6.4 Atividade da Polifenoloxidase (PPO)

Realizada através da conversão de catecol em quinona, com adição de 250 µL de catecol (60 mM), 750 µL do tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) e 250 µL de extrato. As amostras foram aquecidas em banho Maria a 40 °C durante 15 min, seguido de esfriamento. Logo após,

a reação foi paralisada com a adição de 800 µL de ácido perclórico (2,0 M), com a medida de absorvância registrada a 395 nm. Os resultados foram expressos em U.A/min./mg de proteína (DUANGMAL; APENTEN, 1999).

2.7 Análises Físico-Químicas

Todas as análises foram realizadas no início e no final do experimento (décimo segundo dia), com exceção da perda de massa que além das avaliações do início e fim, tinha também a cada dois dias. Vale salientar que, os frutos foram colocados em bandejas de polipropileno em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). E o ponto de máxima eficiência técnica para todas as análises foram encontradas de acordo com Storck et al. (2011).

2.7.1 Perda de Massa

Foi feita através da pesagem dos frutos de tangerineira ‘Dancy’ em balança semi-analítica, com capacidade para 15 kg e sensibilidade para 5 g, tomando-se como base o peso inicial.

2.7.2 Sólidos Solúveis Totais (SST)

Foi realizado com suco extraído de fatias de frutos de tangerineira ‘Dancy’ cortados longitudinalmente e determinado em refratômetro digital, com correção automática de temperatura, sendo os resultados expressos em °Brix (AOAC, 2005).

2.7.3 Acidez Titulável

Foi determinada por titulação com 25 mL de suco, em solução de hidróxido de sódio a 0,3125 N, usando-se a fenolftaleína como indicadora e o resultado foi expresso em porcentagem de ácido cítrico.100 g⁻¹ de suco dos frutos de tangerineira ‘Dancy’ (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

2.7.4 Relação SST/AT

Obtida através da divisão os valores médios do teor de sólidos solúveis pelas médias da acidez titulável. Os frutos estavam acondicionados em bandejas de polipropileno em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). E as análises foram feitas no início e no fim do experimento (décimo segundo dia).

2.7.5 Potencial hidrogeniônico (pH)

Foi extraído uma amostra de 5 mL de suco de tangerineira ‘Dancy’, homogeneizada em 50 mL de ADE. Onde foi feito a leitura em um peagâmetro de bancada com correção automática dos valores em função da temperatura (AOAC, 2005).

2.7.6 Ácido Ascórbico

Foi determinada através da redução do 2,6-diclorofenolindofenol-sódio (DCFI) pelo ácido ascórbico, adicionados 5 mL do suco e 50 mL de ácido oxálico 1%. Posteriormente, foi titulada a solução com o DCFI até coloração rosa persistente por 15 segundos. Os teores de ácido ascórbico das amostras foram calculados usando-se uma solução padrão e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico 100 mL⁻¹ da amostra (ITA, 1990).

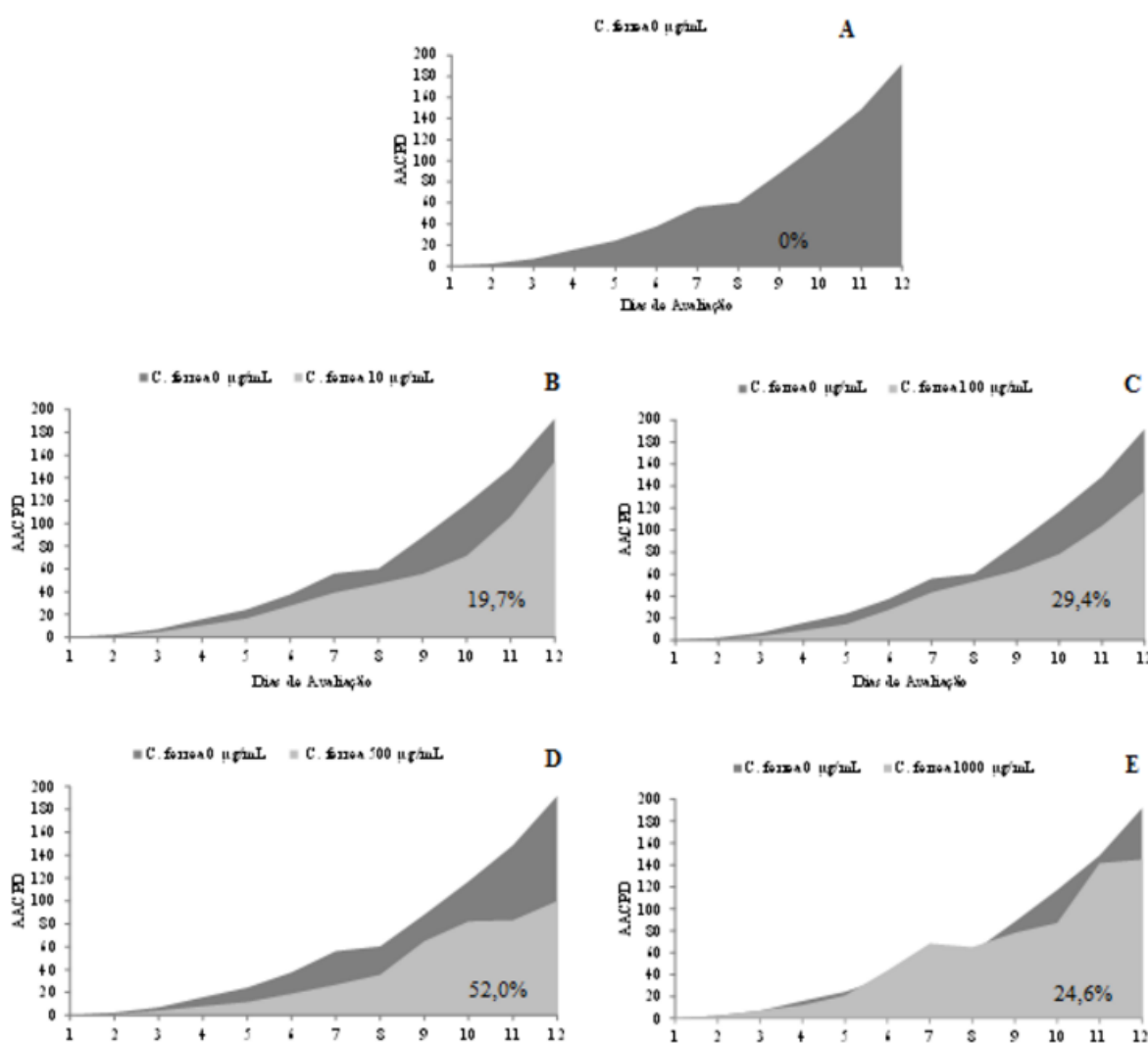
2.8 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos (0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*), (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L da Quitosana®), (10¹⁰ esporos/mL de *T. asperellum*) e cinco repetições de cinco frutos, constituindo uma unidade experimental com 250 frutos de tangerineira ‘Dancy’. Foi realizada análise de regressão para as concentrações dos tratamentos. As comparações com a testemunha foram feitas através da aplicação do teste de Dunnett ($P \leq 0,05$) no programa SAS® System 9.3 (SAS Institute, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliações da AACPD

Quando utilizou-se o extrato de *C. ferrea* em frutos de tangerineira ‘Dancy’ observou-se diferença estatística nos tratamentos avaliados, visto que nas concentrações 10; 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, verificaram-se as menores percentagens de proteções 19,7; 29,4 e 24,6% e consequentemente as maiores AACPD. Já a concentração 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentou a maior percentagem de proteção 52,0% e a menor AACPD para MMA quando comparada com a testemunha 0 $\mu\text{g/mL}$ até o décimo segundo dia de avaliação (Figuras 2A, B, C, D e E).



Figuras 2. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. citri (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações: (A) 0; (B) 10; (C) 100; (D) 500 e (E) 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação à testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

A menor proteção apresentada pelas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ pode ter ocorrido, segundo Rabea et al. (2009) devido a quantidade de compostos bioativos e sua ação

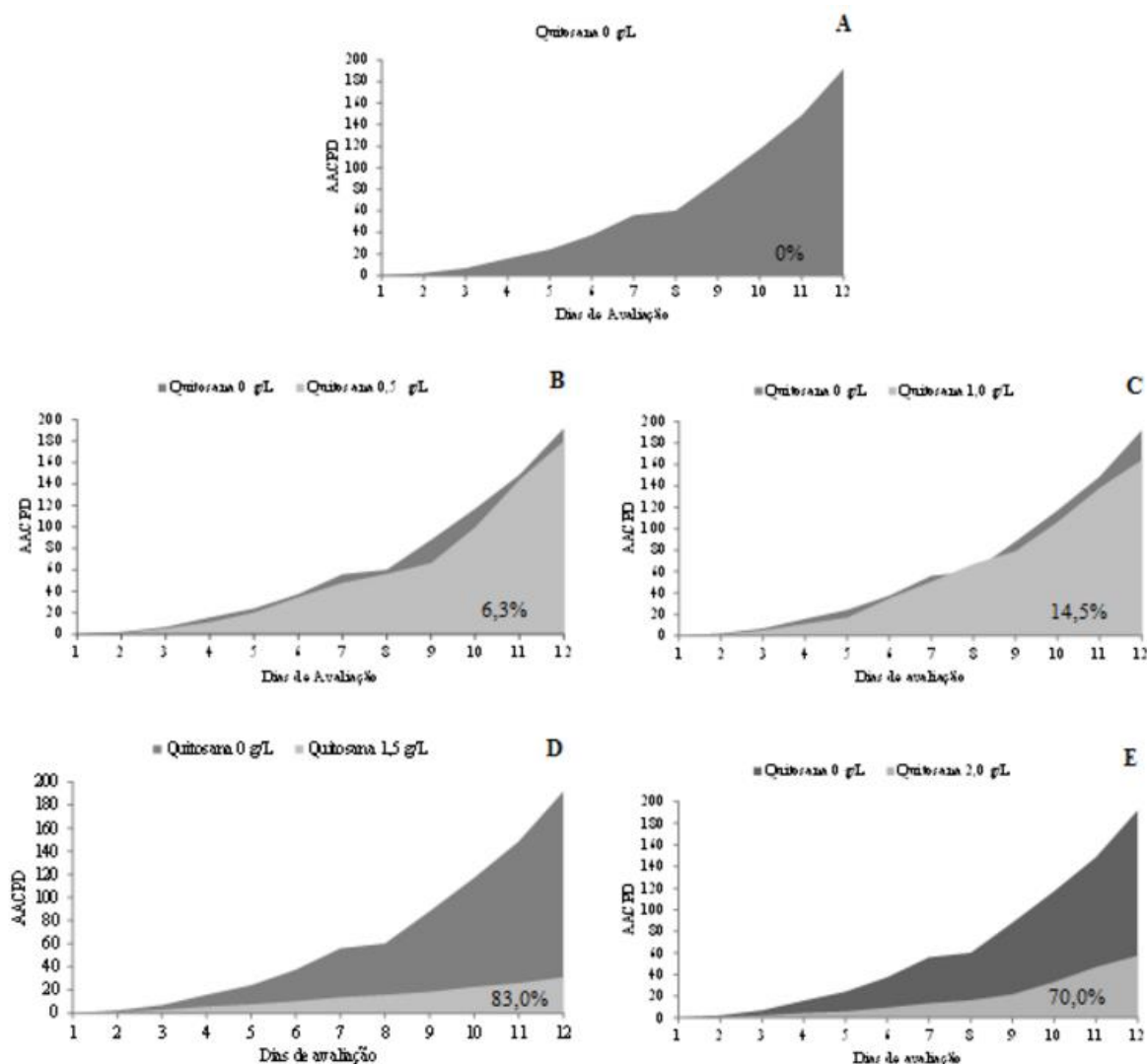
podendo ter interferido ou não no metabolismo e crescimento de diversos patógenos através de mudanças morfológicas, alterações estruturais e desorganização molecular. De acordo com Loquercio et al. (2005) o baixo acúmulo dos compostos deve ter ocorrido devido a complexação dos taninos com íons metálicos, que pode ter diminuído a disponibilidade desses íons e por isso não promoveu alteração no metabolismo dos microrganismos.

Na maior concentração do extrato de *C. ferrea* (Figura 2E) também observou-se baixo efeito sobre o patógeno, segundo Nicholson; Hammerschmidt (1992) o grande acúmulo de compostos podem ter inibido a atividade de algumas enzimas, bem como o funcionamento de vitaminas responsáveis pela ativação de reações químicas do metabolismo secundário. Também pode ter ocorrido à volatilização de diversos compostos secundários que são responsáveis pela atividade antimicrobiana (SILVA; SANTOS; GOMES, 2014).

Na concentração 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea* verificou-se uma maior proteção nos frutos, a menor AACPD (Figura 2D) para MMA. De acordo com Bariani et al. (2012) *C. ferrea* tem em sua composição química, compostos bioativos associados à síntese das vitaminas, hormônios, proteínas, lipídeos, carboidratos e enzimas como a fenilalanina amônia-liase que é responsável por estimular mecanismos de defesa. Observa-se que a partir de 50% de proteção para a MMA em frutos de tangerineira ‘Dancy’ resultaram nas menores áreas lesionadas. Este comportamento pode ser melhor visualizado nos resultados de AACPD (Figura 2D), onde verifica-se que o melhor desempenho ocorreu na concentração de 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea* quando comparou-se com as demais concentrações. Podendo ser recomendando para o controle preventivo da mancha marrom de alternaria.

Silva Filho (2014) utilizando extrato melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) nas concentrações 1,0 e 2,0 µg/mL, observaram-se as menores taxas da AACPD para MMA em frutos de tangerineira ‘Dancy’. Moura; Silva Filho; Corrêa (2013) utilizaram os extratos de folhas de melão-de-são-caetano e goiabeira (*Psidium guajava* L.) na concentração de 20%, verificaram redução da severidade da mancha marrom de alternaria em torno de 80% respectivamente, nos frutos de tangerineira ‘Dancy’.

Utilizando a Quitosana® observou-se diferença estatística nos tratamentos avaliados, verificando que nas concentrações 0,5 e 1,0 g/L ocorreram as menores percentagens de proteção (6,3 e 14,5%) e maiores AACPD. Já nas concentrações 1,5 e 2,0 g/L, foram observadas as maiores percentagens de proteções (83,0 e 70,0%), respectivamente, e as menores áreas da AACPD para a mancha marrom de alternaria (MMA) quando comparados com a testemunha (água) até o décimo segundo dia de avaliação (Figuras 3A, B, C, D e E).



Figuras 3. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de tangerineira 'Dancy' (*Citrus tangerina*) inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações: (A) 0; (B) 0,5; (C) 1,0; (D) 1,5 e (E) 2,0 g/L de Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

As maiores concentrações de Quitosana® (Figuras 3D e E) apresentaram as maiores proteções e menores AACPD para a mancha marrom de alternaria em frutos de tangerineira 'Dancy'. Tal fato pode ter ocorrido tanto pelo mecanismo direto. De acordo com Rabea et al. (2009) o grande acúmulo de substâncias tóxicas (efeito fungitóxico) pode ter ocorrido após a infecção, promovendo mudanças morfológicas, alterações estruturais, desorganização molecular dos fungos e ter interferido no crescimento, desenvolvimento e reprodução, através da interação entre as cargas positivas do polissacarídeo com os resíduos de carga negativa das macromoléculas expostos na superfície da célula do patógeno, o que pode resultar em alteração da permeabilidade da membrana, com liberação do conteúdo celular para o meio.

Quanto pelo mecanismo indireto, segundo El Hadrami et al. (2010) quando utiliza-se a Quitosana® em frutos, pode ocorrer a ativação das respostas de defesa, como a lignificação dos tecidos, induzindo a síntese de calose, a produção de fitoalexinas, aumento na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o acúmulo de quitinase e a síntese de inibidores de proteínase, funcionando como uma barreira a penetração do fungo, aumentando a resistência da parede celular e consequentemente reduzindo o potencial de inóculo (GALO et al., 2014).

As menores concentrações da Quitosana® (Figuras 3B e C) apresentaram baixas proteções e as maiores AACPD, portanto, verificou-se que as baixas concentrações, não foram capazes de controlar a mancha marrom de alternaria em frutos de tangerineira ‘Dancy’.

Quando utilizou-se o fungo *T. asperellum* em frutos de tangerineira ‘Dancy’, observou-se proteção 53,6% e uma menor área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) para a mancha marrom de alternaria (MMA) quando comparado com a testemunha até o décimo segundo dia de avaliação (Figura 4).

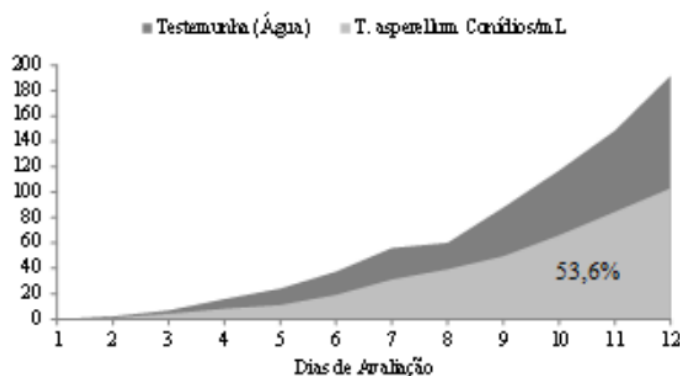


Figura 4. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10⁵ esporos/mL), utilizando o fungo *Trichoderma asperellum* (10¹⁰ esporos/mL) e testemunha. Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett (P < 0,05).

De acordo com as respostas obtidas no presente trabalho, observou-se a eficiência do fungo *T. asperellum* na redução da MMA em frutos de tangerineira ‘Dancy’. Segundo Lucon et al. (2010) quando utilizam-se antagonistas em frutos, podem haver a indução de diversos mecanismos de defesa, como por exemplo o mecanismo direto apresentando o aumento de diversas substâncias tóxicas, voláteis e não voláteis, com amplo espectro na atividade antimicrobiana.

Verifica-se que a partir de 50% de proteção para a MMA em frutos de tangerineira ‘Dancy’ resultaram nas menores áreas lesionadas. Este comportamento pode ser melhor visualizado nos resultados de AACPD (Figura 4), onde verifica-se que o melhor desempenho

ocorreu quando utilizou-se o *T. asperellum* e comparou-se com testemunha. Podendo ser recomendando para o controle preventivo da mancha marrom de alternaria.

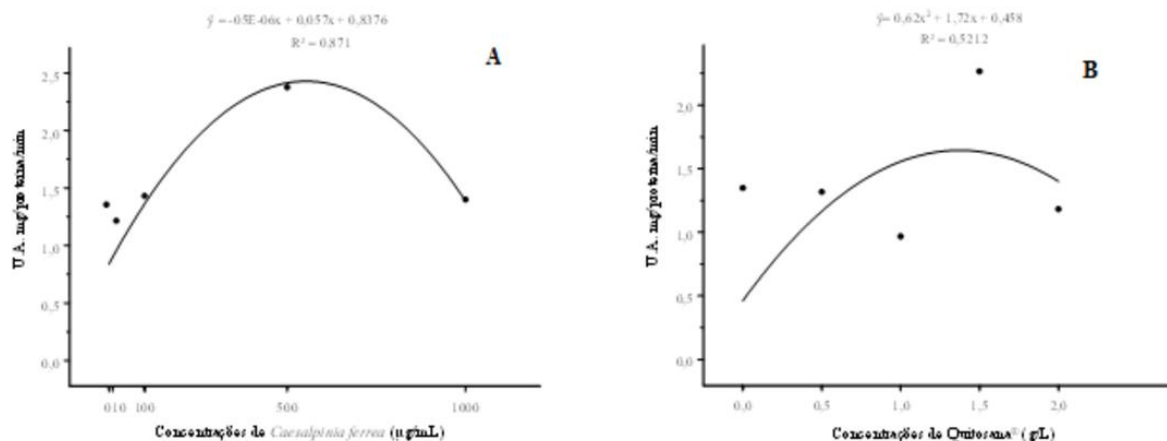
Pandolfo (2011) quando pulverizou frutos de tangerineira ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.) com o *Trichoderma koningii* (Oudem.) Duché & R. Heim em no manejo da pinta preta causada por *Guignardia citricarpa* (Kiely) observou redução na severidade da doença. Oliveira (2012) utilizando o *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) von Arx em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) imersos na suspensão de 10^8 esporos/mL também observou redução da AACPD na podridão do pé, causada por *Phytophthora palmivora* (Butler).

Guimarães (2012) avaliando *Trichoderma* spp. em frutos de laranja Hamlin (*Citrus sinensis* Osbeck) imersos na suspensão 10^7 esporos/mL, constatou-se redução na AACPD para a pinta preta. Ainda de acordo com Lorenzetti (2012) após a pulverização de *Trichoderma* spp. em frutos de morango (*Fragaria vesca* L.) também verificou-se redução na AACPD no manejo da antracnose causada por *C. acutatum*.

3.2 Atividade Enzimática da Fenilalanina amônia-liase, Peroxidase e Polifenoloxidase

Analizando a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em frutos de tangerineira ‘Dancy’, verificou-se que com o aumento das concentrações do extrato de *C. ferrea* de 10 para 100 µg/mL, ocorreram aumentos da atividade da enzima de 1,24 para 1,40 U.A mg/proteína/min, atingindo o ponto de máximo na concentração de 178 µg/mL com atividade 1,60 U.A mg/proteína/min. E nas concentrações 0 e 1000 µg/mL, verificou-se que as atividades apresentaram comportamentos bem próximos 1,28 e 1,50 U.A. mg/proteína/min (Figura 5A).

Verificando a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ observou-se que com o aumento das concentrações da Quitosana® de 0,5 para 1,5 g/L, ocorreram aumentos das atividades da enzima de 1,25 para 2,25 U.A. mg/proteína/min, atingindo o ponto de máximo na concentração 1,30 g/L com atividade 1,19 U.A. mg/proteína/min. Já nas concentrações 0; 1,0 e 2,0 g/L, ocorreram comportamentos bem próximos para a atividade desta enzima 1,28; 1,23 e 1,25 U.A. mg/proteína/min (Figura 5B).



Figuras 5A e B. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea*, Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Constatou-se a atividade da fenilalanina amônia-liase em frutos de tangerineira ‘Dancy’, quando se utilizou o antagonista *T. asperellum* e quando comparou com a testemunha, verificou-se que ambas as atividades foram semelhantes apresentando médias 1,25 U.A. mg/proteína/min.

Analisando a atividade da peroxidase (POD) em frutos de tangerineira ‘Dancy’, verificou-se que quando aumentaram-se as concentrações do extrato de *C. ferrea* 0; 10 e 500 µg/mL, ocorreram aumentos na atividade da enzima 128,74; 172,0 e 307,34 U.A. mg/proteína/min, atingindo o ponto de máximo na concentração 541,2 µg/mL com atividade 283,36 U.A. mg/proteína/min. Já nas concentrações 100 e 1000 µg/mL, ocorreram comportamentos bem próximos para a atividade da enzima 148,68 e 192,15 U.A. mg/proteína/min (Figura 6).

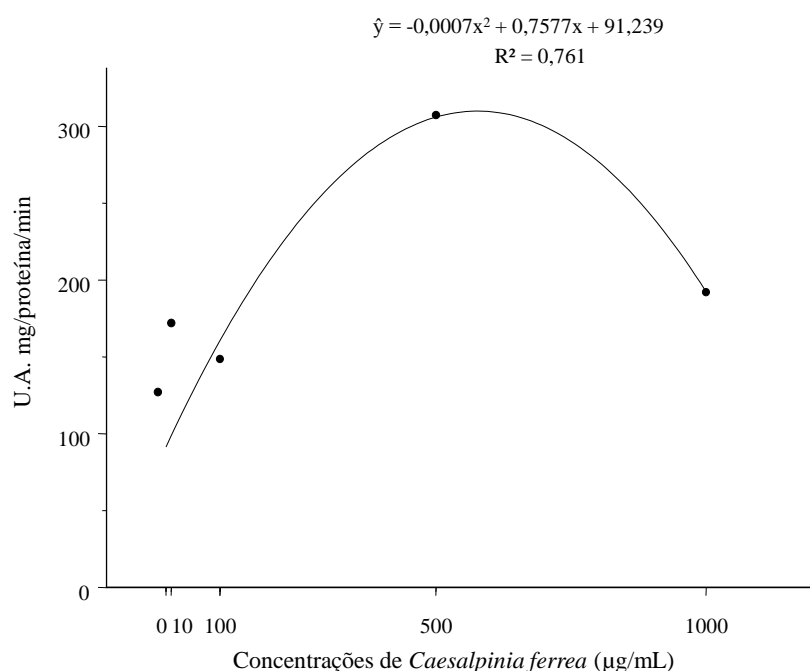


Figura 6. Atividade da enzima Peroxidase em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Quando utilizaram-se as concentrações de Quitosana[®], o fungo *T. asperellum* e comparou-se com a testemunha, não se observou diferença estatística para as atividades enzimáticas da peroxidase e polifenoloxidase em frutos de tangerineira ‘Dancy’, verificando-se que as atividades da POD apresentaram médias 139,80; 107,28; 179,24; 99,34; 135,51 e 128,74 U.A. mg/proteína/min e a PPO 1,65; 1,29; 2,39; 1,49; 0,32 e 1,28 U.A. mg/proteína/min, respectivamente.

Vale salientar que não foram observadas alterações nas atividades enzimáticas em relação as concentrações estudadas, porém, verificou-se altas atividades da peroxidase e polifenoloxidase nas avaliações realizadas no início e final do experimento. Tal fato pode ser explicado por Pedroza (2013) quando afirmaram que o aumento da atividade da peroxidase e polifenoloxidase pode estar associado a biossíntese de lignina, que atuam nas células vizinhas às infectadas e aos ferimentos as quais direcionam um sistema de defesa na área do ferimento. Também lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo no local da descompartimentalização celular provocadas por patógenos. Visto que, um dos resultados mais estudados deste fenômeno é o aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas.

Apenas as concentrações 500 µg/mL e 1,5 g/L do extrato de *C. ferrea* e de Quitosana® promoveram as maiores proteções nos frutos, as menores AACPD (Figuras 2D e 3D) para MMA e também as maiores atividades das três enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) (Figuras 5A e B), peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO). O aumento das atividades dessas enzimas foram fundamentais no controle da MMA, pois elas estimularam os mecanismos de defesa responsável pela indução da resistência em frutos de tangerineira ‘Dancy’.

Tal fato pode ser comprovado por Almeida et al. (2012) quando afirmaram que a fenilalanina amônia-liase é uma das enzimas-chave na rota dos fenilpropanóides, responsável pela desaminação da L-fenilalanina com consequente formação do ácido trans-cinâmico que influencia na síntese de flavonoides e isoflavonoides.

Esta enzima é de extrema importância para o desenvolvimento normal da planta, como exemplo a regulação do alongamento e ligação entre os polissacarídeos de parede celular (GUIMARÃES et al., 2015). E também é precursora de pigmentos como as antocianinas e auxiliam na proteção contra os estresses abióticos e bióticos pela ação de fitopatógenos, promovendo o aumento da atividade e consequentemente aumentando a síntese das substâncias como os compostos fenólicos e as moléculas sinalizadoras incluindo as fitoalexinas e ligninas (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico e ácido sinápico) que podem ser tóxicas aos patógenos (MARIANGEL et al., 2013)

A peroxidase reforça a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999), atua na síntese de fenólicos, como molécula sinalizadora para a síntese de fenilalanina amônia-liase que possuem ação antimicrobiana, funciona também como sinalizadores e induz a produção de fitoalexinas, ativa a produção de proteínas quinases ou genes de defesa na planta (FURSTENBERG-HAGG; ZAGROBELNY; BAK, 2013) e também auxiliam na morte programada da célula (BHATTACHARJEE, 2012).

A atividade dessa enzima pode ser alterada por estresse provocado pela infecção de fungos patogênicos que promoverá o aumento dos níveis de enzimas oxidativas, como catalase ou ascorbato peroxidase para contornar o sistema de defesa da planta contra a patogenicidade (FURSTENBERG-HAGG; ZAGROBELNY; BAK, 2013), além de funcionar como chave reguladora de uma ampla variedade de processos fisiológicos, tais como a senescência, fotorespiração e fotossíntese, movimento estomático, ciclo celular, crescimento e desenvolvimento celular (QUAN et al., 2008).

A atividade polifenoloxidase tem sido atribuída à construção de parede celular dos vegetais (frutas e hortaliças), além da formação de complexos proteicos, cicatrização de tecidos

provocados por danos. Outro papel fundamental desta enzima é a produção de quinonas com ação antimicrobiana e os polímeros podem atuar como taninos, formando complexos de proteínas que atuam como uma barreira física, dificultando a entrada de patógenos, como também, controlando os níveis de oxigênio dos cloroplastos (ALVARENGA; MELO; SHIRAHIGE, 2013), atuando como uma linha de defesa adicional na proteção de plantas a ataques de patógenos.

3.3 Análises Físico-Químicas

3.3.1 Perda de Massa

Avaliando a perda de massa quando se utilizou o extrato de *C. ferrea*, Quitosana® e *T. asperellum* em frutos de tangerineira ‘Dancy’, não se observou diferença estatística quando comparados a testemunha, apresentando médias de perda de massa 2,3; 2,4; 2,7 e 2,5%, respectivamente, até o décimo segundo dia de avaliação.

Apesar de ter ocorrido a infecção do patógeno em frutos de tangerineira ‘Dancy’ em todos os tratamentos avaliados, houve a manutenção da água dentro das células, evitando o murchamento dos frutos. Portanto, verificou-se baixa perda no teor de água, encontrando-se na faixa mínima estabelecida por Chitarra; Chitarra (2005) quando descreveram que a faixa de 3 a 6% de perda de massa é tolerável para manter a qualidade dos frutos.

Martins et al. (2014) afirmaram que existe correlação entre a severidade da doença e a perda de massa dos frutos, uma vez observada que quanto maior a severidade, maior será a perda de massa, visto que o patógeno *A. alternata* sintetiza complexos enzimáticos capazes de degradar a celulose presente nos frutos, além do fato de que a cutícula também pode ser rompida em função do ataque do patógeno, resultando na perda de integridade e na diminuição na coesão das células vegetais.

Nascimento; Santos (2013) avaliando produtos alternativos no controle do bolor verde, causado por *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. na pós-colheita de Lima Ácida ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia* Tanaka), observaram que a perda de massa variou de 1,31 a 1,44% até o décimo dia de avaliação. Maro (2010) estudando o manejo do bolor verde em frutos de tangerineira ‘Ponkan’ verificou comportamento semelhante quando avaliou o extrato de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) apresentando média de 1,06%. Porém, quando utilizou-se a Quitosana® a perda de massa foi mais alta, em torno de 1,49% até o oitavo dia de armazenamento.

3.3.2 Sólidos Solúveis Totais (SST)

Avaliando o teor de sólidos solúveis totais (SST), verificou-se que não ocorreram diferenças estatísticas nos tratamentos quando utilizou-se o extrato de *C. ferrea*, Quitosana® e

T. asperellum e comparou com a testemunha, apresentando médias 10,25; 10,41; 11,55 e 10,60 °Brix, respectivamente, em frutos de tangerineira ‘Dancy’. Todos os valores de SST encontrados no presente trabalho estão acima da faixa descrita pela CEAGESP (2000), pois, para sólidos solúveis a taxa mínima estabelecida para tangerineiras é a partir de 9,0 °Brix.

Embora as associações entre as infecções causadas por diversos patógenos, bem como os danos e as altas taxas de sólidos solúveis tenham sido relatadas em frutas cítricas, essa avaliação não foi capaz de auxiliar no entendimento sobre a resistência/suscetibilidade para a mancha marrom de alternaria em frutos de tangerineira ‘Dancy’, pois, apesar de ter apresentado altos valores de SST, não se verificaram grandes variações nos tratamentos avaliados, independente da eficiência dos produtos alternativos, bem como, as concentrações utilizadas, até o último dia de avaliação.

Nascimento; Santos (2013) testando produtos alternativos no controle do bolor verde causado por *P. digitatum* na pós-colheita de Lima Ácida ‘Tahiti’ (*C. latifolia*) verificaram que o teor de sólidos solúveis na faixa de 7,8 a 8,16 °Brix para o tratamento utilizando bicarbonato de sódio e a faixa de 7,8 a 8,11 °Brix para o tratamento com carbonato de sódio. Anjos et al. (2014) estudando diversas características pós-colheita de ‘Laranja Pêra’ (*C. sinensis*) submetidas a tratamentos alternativos no controle de podridão parda causada por *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Sarej. verificaram valores superiores para sólidos solúveis apresentando faixa de 10,95 a 12,17 °Brix.

3.3.3 Acidez Titulável

Analisando a acidez em frutos de tangerineira ‘Dancy’ quando utilizou-se o extrato de *C. ferrea* e *T. asperellum* não observaram-se diferenças estatísticas quando comparados a testemunha, apresentando médias de 1,0; 1,5 e 2,1% de ácido cítrico/100 g.

Os tratamentos utilizando o *C. ferrea*, *T. asperellum* e testemunha não apresentaram variações no teor de acidez titulável em frutos de tangerineira ‘Dancy’ até o décimo segundo dia de avaliação.

No tratamento utilizando a Quitosana® observou-se que, quando aumentou a concentração de 0 para 0,5 g/L, ocorreu diminuição de 2,10 para 0,96 de ácido cítrico/100g. E a partir da concentração 1,0 g/L até 2,0 g/L, verificou-se aumento 0,98; 1,24 e 1,43 no teor de ácido cítrico/100 g, atingindo o ponto de mínimo na concentração 1,13 g/L apresentando 0,99 de ácido cítrico/100 g (Figura 7).

Pode-se afirmar que todas as taxas de acidez obtidas no presente trabalho estão dentro dos valores 0,6 a 2,2 no teor de ácido cítrico/100 g estabelecidos para as tangerineiras, de acordo com a classificação descrita pelo Centro de Qualidade em Horticultura (CEAGESP, 2000).

Verificou-se que nas maiores concentrações 1,5 e 2,0 g/L da Quitosana® apresentaram redução da AACPD para a mancha marrom de alternaria (Figuras 3D e E) e aumentaram as taxas de ácido cítrico/100g (Figura 7). Tal fato foi explicado por Northover; Biggs (1990) quando afirmaram que existe correlação das doenças com as taxas de acidez, visto que, nos frutos infectados, observa-se aumento na taxa da acidez. Segundo Han et al. (2004) trabalhando com frutos de morangos tratados com Quitosana®, observaram que o aumento na concentração do polissacarídeo pode ter influenciado no retardamento da maturação dos frutos, ocorrendo apenas pequenas quantidades dos ácidos orgânicos, principalmente o cítrico e o málico que promoveram a redução no processo respiratório via ciclo de Krebs.

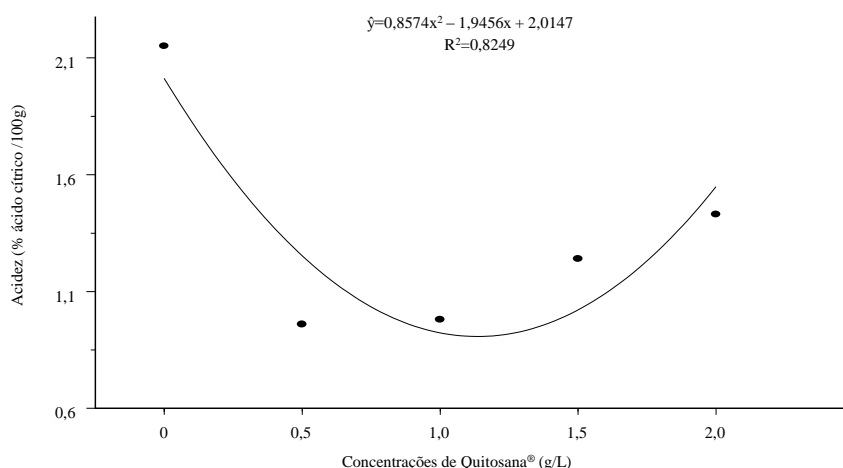


Figura 7. Avaliação da acidez em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações de Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Detoni et al. (2009) quando avaliaram as características físicas e químicas da tangerineira ‘Ponkan’ (*C. reticulata*) obtiveram faixa da acidez de 0,76 a 2,36 de ácido cítrico/100 g. Dantas (2012) utilizando a Quitosana® na concentração 4% em frutos de tangerineira ‘Ponkan’, encontrou valor médio de 2,93 de ácido cítrico/100 g até o décimo oitavo dia de armazenamento.

3.3.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

Avaliando a pH quando utilizou-se o extrato de *C. ferrea*, *T. asperellum* e testemunha não observaram-se diferenças estatísticas, apresentando médias 3,2; 3,1 e 3,0, respectivamente.

Já no tratamento utilizando a Quitosana[®], verificou-se que com o aumento das concentrações de 0 a 0,5, ocorreram aumento no pH de 0,3 a 3,35. Atingindo o ponto de máximo na concentração 1,35 g/L com pH 3,35 e nas concentrações de 1,0 até a 2,0 g/L ocorreram reduções no potencial hidrogeniônico (Figura 8). Pode-se afirmar que os valores de pH obtidos no presente trabalho estão dentro da faixa 3,2 a 5,43 obtida por Couto; Canniatti-Brazaca (2010) quando avaliaram as características químicas aceitáveis para diversas variedades cítricas.

A pequena variação do pH apresentada nas pesquisas supracitadas, pode ter equilibrado o sistema metabólico dos frutos, pois, de acordo com Chitarra; Chitarra (2005) os ácidos orgânicos (livres ou esterificados) presentes na célula, podem estar associados a sais de potássio que constituem os sistemas tampões, apresentando um importante papel na regulação enzimática dos frutos.

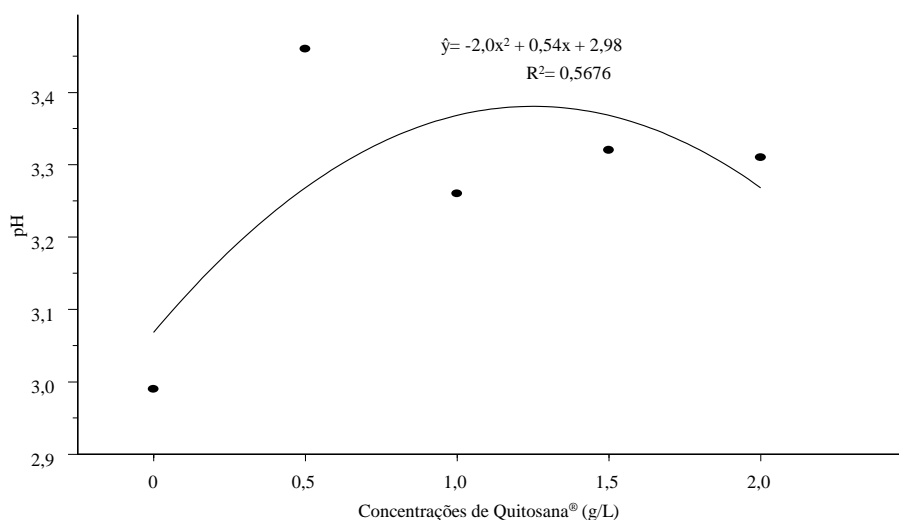


Figura 8. Potencial hidrogeniônico em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações da Quitosana[®] e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Os valores de pH obtidos foram semelhantes quando comparados com os de Oliveira; Brunini; Nunes (2014) quando avaliaram tangerineira ‘Ponkan’ e constatarem valores entre 3,68 e 4,12. Estudos realizados por Silva et al. (2014) sobre a qualidade de tangerinas ‘Ponkan’ também corroboraram com os valores de pH da presente pesquisa, apresentando faixa entre 4,39 a 4,42.

3.3.5 Relação SST/AT

Analisando a relação SST/AT quando aplicaram-se os tratamentos extrato de *C. ferrea*, *T. asperellum* e testemunha não verificaram-se diferença estatística, apresentando médias 6,0; 6,7 e 4,9, respectivamente.

Já no tratamento utilizando a Quitosana®, verificou-se que quando se aumentaram as concentrações do polissacarídeo de 0 a 0,5 g/L, ocorreram aumentos de 5,0 para 11,0 na relação SST/AT, atingindo o ponto de máximo na concentração 1,05 g/L com 10,1 para SST/AT. A partir da concentração 1,0; 1,5 até 2,0 g/L observou-se diminuição 9,8; 8,0 e 7,5 na SST/AT em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (Figura 9).

Os valores apresentados no presente trabalho estão dentro da faixa de *ratio* de 6 a 20, ideal para tangerineira, classificada por Viégas (1991), visto que a relação SST/AT acima de 7 têm qualidade adequada para serem consumidos os frutos *in natura* (SALVADOR et al., 2002).

As taxas de SST/AT obtidas no presente trabalho mostraram que em alguns tratamentos da Quitosana®, podem ter reduzido às atividades metabólicas nos frutos de tangerineira ‘Dancy’, influenciando também na diminuição da atividade respiratória e retardando o processo de maturação dos frutos.

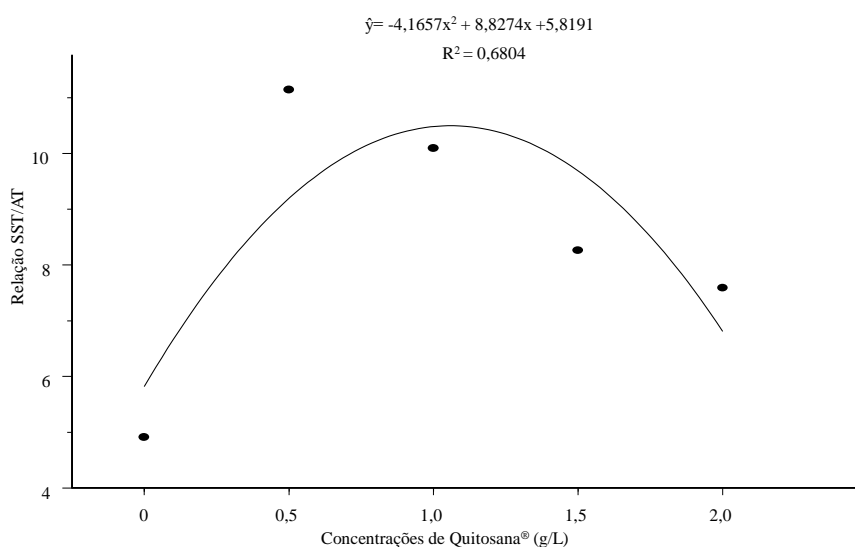


Figura 9. Relação sólidos solúveis totais/acidez titulável em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações de Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação à testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Valores próximos ao presente trabalho foram encontrados por Silva et al. (2014) avaliando a relação SS/AT em frutos de tangerineira ‘Ponkan’, observaram média de 7,8. Rodrigues (2013) avaliando a qualidade de frutos da tangerineira ‘Dancy’ encontrou valores superiores de SS/AT na faixa de 8,99 a 10,43.

3.3.6 Ácido Ascórbico

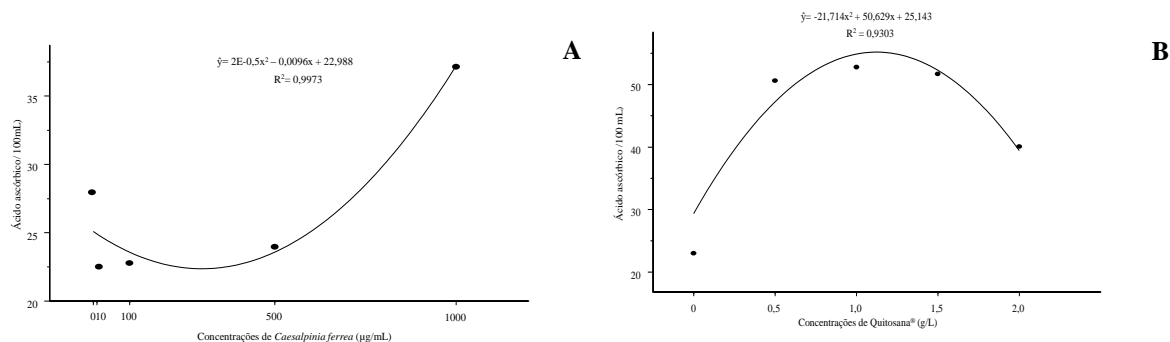
À medida que aumentaram-se as concentrações 10; 100; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *C. ferrea*, elevaram-se as taxas de 22,51; 22,77; 23,96 até 37,13 mg ácido ascórbico 100 mL^{-1} . Atingindo o ponto de mínimo na concentração 96 $\mu\text{g/mL}$ com taxa de 22,98 mg de ácido ascórbico 100 mL^{-1} em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (Figura 10A).

Em relação ao tratamento *T. asperellum* não foram observadas diferenças estatísticas quando se comparou com a testemunha apresentando médias de 22,5 e 22,5 mg de ácido ascórbico 100 mL^{-1} em frutos de tangerineira ‘Dancy’.

No tratamento utilizando a Quitosana®, verificou-se que à medida que se aumentaram-se as concentrações de 0 até 1,0 g/L ocorreram aumentos nas taxas de 23; 50 até 52 mg ácido ascórbico 100 mL^{-1} , atingindo o ponto de máximo na concentração 1,16 g/L, apresentando taxa de 50 mg ácido ascórbico 100 mL^{-1} . A partir da concentração 1,5 g/L observaram-se reduções de 50 para 41 nas taxas de ácido ascórbico em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (Figura 10B).

Verificou-se que as taxas de ácido ascórbico obtidos no presente trabalho estão dentro da faixa (20 a 50 mg de ácido ascórbico 100 mL^{-1}) aceitável para as tangerineiras, descrita por Detoni et al. (2009). Pode-se afirmar que no presente trabalho, houve correlação da redução da severidade da MMA (Figuras 2D e 3D) com a expressão do ácido ascórbico e qualidade dos frutos de tangerineira ‘Dancy’.

Esse fato pode ser explicado Pereira (2008) devido o ácido ascórbico possuir características antioxidantes e nutricionais, torna um poderoso aditivo responsáveis por inúmeros mecanismos de atuação e proteção dos frutos, contribuindo na produção de compostos com potencial antioxidante, como as vitaminas C que são capazes de interceptar os radicais livres, preservando a sua qualidade e mantendo a integridade das células. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que essa vitamina na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais H_2O_2 e OH^\cdot que são espécies reativas de oxigênio, fundamentais para o sistema de defesa dos frutos no controle de patógenos (PELLEGRINI et al. 2007).



Figuras 10A e B. Ácido ascórbico em frutos de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculados com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea*, Quitosana® e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Rodrigues (2013) avaliando as taxas de ácido ascórbico em frutos de tangerineira ‘Dancy’, encontrou médias variando de 35,53 a 44,34 mg.100 mL⁻¹. Esses valores estão próximos aos reportados por Pinto; Vilas Boas; Damiani (2007) em frutos de tangerina ‘Ponkan’ minimamente processado, os quais variaram entre 38,95 a 59,08 mg.100 mL⁻¹. Tais valores foram maiores do que os encontrados por Couto; Canniatti-Brazaca (2010) quando obteve uma taxa de 21,47 mg.100mL⁻¹ de ácido ascórbico em tangerinas Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*).

4 CONCLUSÕES

- ✓ As concentrações 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea*, 1,5 g/L de Quitosana® e *T. asperellum* reduziram a severidade da MMA, promoveram alta atividade das enzimas fenil alanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase e em todos os tratamentos mantiveram a qualidade pós-colheita em frutos de tangerineira ‘Dancy’.

REFERÊNCIAS

- AGRONEGÓCIOS- **Em Rio Real, Bahia, produtores comemoram a safra da laranja.** Disponível em:< <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2014/05/em-rio-real-bahia-produtores-comemoram-safra-da-laranja.html>>. Acesso em: 15 Mai. 2014.
- ALMEIDA, H.O.; BARBOSA, M.O.; MARQUES, A.R.; T.H.A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M.J.; TESSAROLLO, N.G.; GAMES, P.D.; BARROS, E.G.; MOREIRA, R.S.; GUIMARÃES, F.C.M.; ABDELNOOR, R.F.; PEREIRA, P.R.G.; PEREIRA, M.C.B. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.47, n.2, p.163-172. 2012.
- ALVARENGA, M.A.R.; MELO, P.C.T.; SHIRAHIGE, F.H. Cultivares In: Alvarenga, M.A.R. **Produção em campo, cada de vegetação e hidroponia**. 2ª Ed. Lavras. Editora Universitária de Lavras-MG, 2013. p.49-59.
- ANJOS, V.D.A; TERAIO, D.; VIECELLI, M.P.; SILVA A.M. da. Aspectos qualitativos de laranja pera submetida a tratamento alternativo na pós-colheita para controle de podridão. **IV congresso do instituto nacional de ciência e tecnologia de frutos tropicais**. 1p. 2014.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 17th ed. 2005. 1115p.
- BARIANI, A.; GONÇALVES, J.F.C.; CHEVREUIL, L.R.; CAVALLAZZI, J.R.P.; SOUZA, L.A.G.; BENTES, J.L.S.; PANDO, S.C. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphyllae* o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu-SP, v.38, n.2, p.131-138, 2012.
- BHATTACHARJEE, S. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. **Journal of Botany**, São Paulo-SP, 2012.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248- 254, 1976.

CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola Tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, p.429-433, 1999.

CARRERA, G.C.; BENEDITO, E.F.; SOUZA-LEAL, T.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; GASPI, F.O.G. Testes físico-químicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas-SP, v.16, n.4, p.938-944, 2014.

CEAGESP. **Programa brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigranjeiros. Centro de qualidade em horticultura – CEAGESP**, (2000). Disponível em: <www.ceagesp.gov.br/produtor/classific/fc_tangerina>. Acesso em: 20 Ago. 2014.

CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL-FAEPE, 2005. 785p.

CIA, P.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; GARCIA, E.O. Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui ‘rama forte’. **Bragantia**, Campinas-SP, v.69, p.745-752, 2010.

CITRICULTURA. **Citricultura paulista**. Disponível em: <<http://al-sp.jusbrasil.com.br/noticias/100027157/citricultura-paulista-autoridades-e-liderancas-discutem-medidas-que-contemplem-setor>>. Acesso em: 12 Jan. 2013.

CITRUS BR- **Retrato da citricultura**. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf>. Acesso em: 23 Set. 2013.

COLTURATO, A.B. **Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. citri, causador da mancha marrom do tangor murcote**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas, São Paulo-SP. 2006.

COSTA, T.L.E.; OLIVEIRA, T.A.; SANTOS, F.K.G.; AROUCHA, M.M.; LEITE, R.H. L. Avaliação de coberturas comestíveis compostas por quitosana e argila no revestimento em

tomates sob refrigeração pelo método dipping. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró-RN, v.7, n.5, p.12-19, 2012.

COTTAS, M.P. **Mancha marrom de alternaria, uma opção de controle**. Disponível em:<http://www.agrofit.com.br/portal/index.php?view=article&catid=54:citros&id=10:mancha-marrom-de-alternaria-uma-opcao-decontrole&option=com_content&Item=18>. Acesso em: 18 Fev. 2011.

COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v.30, n.1, p.15-19, 2010.

DANTAS, R.L. **Qualidade e Conservação Pós-Colheita sob Recobrimentos Biodegradáveis de Tangerina ‘Ponkan’ Produzida no Território da Borborema**. 2012. 50f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. 2012.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. ‘Chitosan -A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications’, **Progress in Polymer Science**, Amsterdam, v.36, n.8, p.981–1014, 2011.

DEL ROVERE, N.S. **Programas de pulverização com fungicidas sistêmicos e cúpricos em diferentes combinações no controle da mancha preta dos citros**. 2013. 42f. Dissertação (Mestrado). Fundo de Defesa da Citricultura, São Paulo-SP. 2013.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M.M. Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem ferimentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.25, n.3, p.494-497, 2003.

DETONI, M.A.; HERZOG, N.F.M.; OHLAND, T.; KOTZ, T.; CLEMENTE, E. Influência do sol nas características físicas e químicas da tangerina ‘Ponkan’ cultivada no Oeste do Paraná. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v.33, n.2, p. 624-628, 2009.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Baltimore, v.7, p.1085-1097, 1995.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var.Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, p.351-359, 1999.

EL HADRAMI, A; ADAM, L. R; EL HADRAMI, I; DAAYF, F. Chitosan in plant protection (review). **Mar Drugs**. **Everest Biotech**, Reino Unido, v.8, p.968-987, 2010.

FATTA DEL BOSCO, S.; SIRAGUSA, M.; ABBATE, L.; LUCRETTI, S.; TUSA, N. Production and characterization of new triploid seedless progenies for mandarin improvement. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.114, p.258–262, 2007.

FURSTENBERG-HAGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v.14, p.10242- 10297, 2013.

GALO, J. de Q.B.; SOUZA, M.L. de. KUSDRA, J.F.; MATTIUZ, C.F.M. Conservação pós-colheita de mamão ‘sunrise solo’ com uso de quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.36, n.2, p.305-312, 2014.

GUIMARÃES, C.G. **Manejo da mancha preta dos citros através da utilização de agentes de controle biológico**. 2012. 42f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP. 2012.

GUIMARÃES, S.S.; MAZARO, S.M.; FREDDO, Á.R.; WAGNER JÚNIOR, A. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas-SP, v.17, n.1, p.143-149, 2015.

HAN, C.; LEDERER, C.; MCDANIEL, M.; ZHAO, Y. Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria vesca* L.) coated with chitosan-base edible coatings. **Journal of Food Science**, Chicago, v.70, p.172-178, 2004.

IAC/CEAGESP. **Programa brasileiro para a melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigrangeiros**. Classificação das Tangerinas. Centro de Qualidade em Horticultura. Folder. São Paulo-SP, 2000.

IBGE - **Instituto brasileiro de geografia e estatística**: Comentários. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2011/pam2011_comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2011/pam2011_comentarios.pdf)>. Acesso em: 13 Jan. 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: IAL, 4.ed. 1.ed. digital. 2008. 1020p.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Manual técnico de análise química de alimentos**. Campinas-SP, 1990.

KRISTENSEN, B.K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S.K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v.120, p.501-512, 1999.

LIMA, J. de S.; PEREZ, J. O.; BARROS, P. N.; AZEVEDO, L. C.; MENDES, R. B.; PESSOA, R. A. Atividade fungitóxica de extratos vegetais de plantas da caatinga sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Vitis vinifera*. **LV CONNEPI**, Maceió-AL, 2010.

LOQUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A.C. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.41, n.2, p.347-349, 2006.

LORENZETTI, E.R. **Controle de doenças do morangueiro com óleos essenciais e *Trichoderma* spp.** 2012. 106f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 2012.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 3ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. 608p.

LUCON, C.M.M.; GUZZO, S.D.; DE JESUS, C.O.; PASCHOLATI, S.F.; DE GOES, A. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection**, Amsterdam, v.29, n.7, p.66-772, Jul. 2010.

MARIANGEL, E.; REYES-DIAZ, M.; LOBOS, W.; BENSCH, E.; SCHALCHLI, H.; IBARRA, P. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. **Ciência e Investigación Agraria**, Assunção, v.40, n.1, p.161-170, 2013.

MARO, L.A.C. **Controle do bolor verde em citros com produtos alternativos aos agroquímicos**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2010.

MARTINS, J.J.A.; LEITE FILHO, M.T.; PEREIRA, E.M.; SANTOS, Y.M.G.; MARTINS, A.N.A.; SILVA, L.A.; ROCHA, A.P.T. Características fisioquímicas de tangerina "cravo" cultivadas organicamente no brejo paraibano. **1º Simpósio Nordestino de Química**. 1p. 2014.

MOURA, Á.Q.; SILVA FILHO, A.M.; CORRÊA, É.B. Extrato de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) para o controle da mancha de alternaria em tangerina. **VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia**, 5p. 2013.

NASCIMENTO, L.M. do; SANTOS, P.C. Controle de doenças fúngicas e de danos por frio em pós-colheita de lima ácida Tahiti. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.2, p.193-205, 2013.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Califórnia, v.30, p.369-380, 1992.

NORTHOVER, J.; BIGGS, A.R. Susceptibility of immature and mature sweet and sour cherries to *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, p.280-284, 1990.

OLIVEIRA, C.A.; BRUNINI, M.A. de; NUNES, G.S. Qualidade da tangerina 'ponkan' comercializada na ceagespe entreposto de ribeirão preto-sp oliveira. **Nucleus**, Ituverava-SP, v.11, n.2, out. 2014.

OLIVEIRA, T.A.S. **Epidemiologia e controle alternativo da podridão dos frutos de mamoeiro causada por *Phytophthora palmivora* na pos-colheita**. 2012. 111f. Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2012.

PANDOLFO, J.D. **Otimização do manejo da pinta preta causada por *Guinardia citricarpa* Kiely na produção ecológica de tangerinas cv. Montenegrina sob a ótica da pesquisa participativa**. 2011. 177f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul-RS. 2011.

PEDROZA, C.M. **Perfil de isoenzimas e atividade da peroxidase e polifenoloxidase em palmito de pupunha minimamente processado**. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2013.

PELLEGRINI, N. et al. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.87, n.1, p.103-111, 2007.

PEREIRA, V.R. **Ácido Ascórbico – características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria**. 2008. 39f. Monografia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. 2008.

PINTO, K.M.S. **Substâncias bioativas de extratos vegetais no manejo da mancha marrom de alternaria** (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*). 2013. 119f. Tese (Doutorado). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. 2013.

PINTO, D.M.; VILAS BOAS, E.V.B. de; DAMIANI, C. Qualidade de tangerina ‘Ponkan’ minimamente processada, armazenada a 5 °C. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v.31, n.4, p.1131-1135, 2007.

QUAN, L.J.; ZHANG, B.; SHI, W.W.; LI, H.Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v.50, p.2-18, 2008.

RABEA, E.I.; BADAWY M.E.I.; STEURBAUT W.; STEVENS C.V. *In vitro* assessment of N-(benzyl) chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. **European Polymer Journal**, Enschede, v.45, p.237-245, 2009.

RENAUD, M.S.A.; AMORIN, L.; LOURENÇO, S.A.; SPÓSITO, M.B. Escala Diagramática para avaliação da Mancha Marrom de Alternaria de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.29, 2004.

RODRIGUES, A.A.M. **Qualidade de frutos de tangerineira ‘Dancy’ colhidos de plantas de diferentes municípios do território da Borborema**. 2013. 41f. Monografia. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. 2013.

RONCATO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com leveduras (*Sccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agrícola**, Piracicaba-SP, v.55, n.3, p.395-402, 1998.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and patogenicity**. St Paul. APS Press. 1994. 326p.

SALVADOR, A.; MONTEVERDE, A.; VÁZQUEZ, D.; CUQUERELLA, J.; NAVARRO, P. Desverdozación de frutos cítricos con destino a países de ultramar. **Levante Agrícola**, Valência, n.361, p.238-244, 2002.

SAS Institute. 2011. **SAS/STAT®** Versão 9.3: User's guide. SAS Institute Inc., 2011. 8621p.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow mild wing in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.1051-1055, 1977.

SILVA FILHO, A.M. da. **Manejo agroecológico da mancha marrom de alternaria em tangerina com extratos vegetais**. 2014. 35f. Monografia. Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca-PB. 2014.

SILVA, G.C.; SANTOS, C.C.; GOMES, D.P. Incidência de fungos e germinação de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp) tratadas com óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas-SP, v.16, n.4, p.850-855, 2014.

SILVA, A.P.G. DA; SILVA, S. de M.; SCHUNEMANN, A.P.P.; DANTAS, A.L.; DANTAS, R.L.; SILVA, J.A. DA; MENDONÇA, R.M.N. Índices de identidade e qualidade de tangerina 'Ponkan' produzida no estado da Paraíba. **Agropecuária Técnica**, Areia-PB v.35, p.143-149, 2014.

SILVA, R.A. da.; AGRA, A. da. C.; ALEIXO, D. de. L.; NÓBREGA, V.R. da.; DANTAS, E.A. Situação econômica e produtiva da cultura dos citros no estado da Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró-RN, v.6, n.3, p.39-48, 2011.

SPÓSITO, M.B., FEICHTENBERGER, E., PIO, R.M., CASTRO, J.L.; RENAUD, M.S.A. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.28, p.231, 2003.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R. L.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavél-PR, v.10, n.1, p.18-46.2011.

STORCK, L.; GARCIA, D.C.; LOPES, S.J.; ESTEFANEL, V. **Experimentação vegetal**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 200p.

VIÉGAS, F.C.P. A industrialização dos produtos cítricos. In: RODRIGUÉZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura Brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991, v.2, p.898-922.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker diseases resistance. **Phytoparasitica**. Best Dagan, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

MANEJO DA MANCHA MARROM DE ALTERNARIA EM TANGERINEIRA ‘DANCY’ COM EXTRATO DE *Caesalpinia ferrea*

Andréa Celina Ferreira Demartelaere¹; Luciana Cordeiro do Nascimento¹;

¹Laboratório de Fitopatologia, PPGA/CCA/UFPB;

Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Rodovia PB 079, Km 12 CEP 58397-000, Areia
- PB, e-mails: andrea_celina@hotmail.com, lucianacordeiro@cca.ufpb.br

RESUMO – A produção de mudas de citros na Paraíba ainda é baixa quando comparada aos outros estados produtores. E pode estar relacionada aos problemas fitossanitários, como o uso de materiais propagativos infectados por diversos patógenos. Dentre estes, destaca-se o fungo *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri*, agente causal da mancha marrom de alternaria (MMA), doença que pode provocar perdas em mudas e também na produtividade de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka). Para o controle da MMA são empregadas táticas dentro do manejo integrado como o uso de extratos vegetais. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial do extrato vegetal de pau ferro (*Caesalpinia ferrea* (Benth.) Ducke) em respostas de defesa em mudas no manejo da MMA. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, UFPB/CCA, Areia-PB. As mudas com 90 dias após a enxertia foram pulverizadas com extrato de *C. ferrea* nas concentrações 0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL, acondicionadas em câmara úmida e mantidas em temperatura ambiente (28 ± 2 °C). Após 24 horas da pulverização foi realizada a inoculação de *A. alternata* (10^5 esporos/mL) e no quarto dia após a inoculação (DAI), foram realizadas diariamente as avaliações de incidência, severidade, AACPD até atingir a ultima escala de notas que se deu no vigésimo terceiro dia. Para as análises das atividades da fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase foram retiradas três folhas/repetição no primeiro e no vigésimo terceiro dia após aplicação dos tratamentos. O delineamento foi DIC com cinco tratamentos (0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*) e 25 repetições, formando a unidade experimental com 125 mudas. Foi realizada análise de regressão para as concentrações, os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$) no programa SAS® System 9.3. Verificou-se que as concentrações 100 e 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea* reduziram a incidência de *A. alternata* e a severidade da mancha marrom de alternaria (MMA),

apresentaram baixa atividade da enzima fenil alanina amônia-liase, porém, promoveram altas atividades da peroxidase e polifenoloxidase em folhas de tangerineira ‘Dancy’.

Palavras-chave: *Alternaria alternata*, *Citrus tangerina*, Pau-ferro

USING *Caesalpinia ferrea* EXTRACT THE MANAGEMENT OF ALTERNARIA BROWN SPOT IN TANGERINE SEEDLINGS 'DANCY'

ABSTRACT- Production of citrus seedlings in Paraiba is still low when compared to other producing states. And it may be related to phytosanitary problems such as the use of propagative material infected by various pathogens. Among these, there is the fungus *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri*, the causal agent of Alternaria brown spot (MMA), a disease that can cause losses in seedlings and also in tangerine productivity 'Dancy' (*Citrus tangerine* hort. ex Tanaka). For control of MMA are tactics employed with in the integrated management as the use of plant extracts. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential of the plant extract iron wood (*Caesalpinia ferrea* (Benth.) Ducke) in defense responses in tangerine seedlings 'Dancy' in the management of MMA. The experiment was conducted in a greenhouse belonging to the CCA/UFPB, Campus II, Areia-PB. Seedlings 90 days after grafting were sprayed with *C. ferrea* extract at concentrations of 0; 10; 100; 500 and 1000 µg/mL, placed in a humid chamber and maintained at room temperature (28 ± 2 °C). After 24 hours of spraying was carried out the inoculation of *A. alternata* (10^5 spores/mL) and on the fourth day after inoculation (DAI) were performed daily the incidence assessments, severity, AUDPC until reaching the last scale of notes that took place in the twenty-third day. The analysis of the activity of phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase were taken three sheets/repeat the first and twentieth day after application of treatments. The design was completely randomized with five treatments (0, 10, 100, 500 and 1000 µg/mL of *C. ferrea* extract) and 25 repetitions, forming the experimental unit with 125 seedlings. Regression analysis was performed for the concentrations the data were submitted to ANOVA and the means compared by Dunnett test ($P \leq 0,05$) in SAS® System 9.3 program. Was found that the concentrations 100 and 500 µg/mL *C. ferrea* extract reduced the incidence of *A. alternata* and severity of the stain alternaria (MMA) had low activity of phenylalanine ammonia-lyase enzyme, however, promoted high peroxidase activity and polyphenol oxidase in leaves of tangerine 'Dancy'.

Key words: *Alternaria alternata*, *Citrus tangerina*, Ironwood

1 INTRODUÇÃO

A citricultura faz parte do agronegócio brasileiro merecendo destaque os Estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, que juntos contribuíram com uma produção em torno de um milhão de toneladas de tangerineiras na safra de 2014 (IBGE, 2015). No Nordeste brasileiro, destacam-se os Estados da Bahia e Sergipe como maiores produtores. A Paraíba atingiu uma produção de aproximadamente 20 mil toneladas, sendo a tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka) uma das variedades mais cultivadas no pólo citrícola (IBGE, 2015).

A alta produção de citros ocorre principalmente na região sudeste e está aliada ao sucesso no sistema de produção de mudas, devido à implantação de técnicas no manejo que aperfeiçoam o processo produtivo, com o uso de variedades resistentes e produtivas, tratos culturais, métodos de condução de enxertia, emprego de reguladores vegetais, inseticidas, fungicidas e adubação adequada (MORALES; SANTOS; TOMAZELI, 2012). Entretanto, quando o manejo é utilizado de forma correta, promovem maior desenvolvimento do sistema radicular, crescimento intenso e uniformidade das plântulas, padronizando o processo de formação das mudas em curto intervalo de tempo, contribuindo para a obtenção de um material propagativo de elevada qualidade (MORAIS et al., 2012).

Porém, a produção de mudas de citros da Paraíba ainda é baixa quando comparada com os outros estados produtores, e tal fato pode estar relacionado aos problemas fitossanitários que ocorrem dentro dos viveiros, contribuindo para o aumento na incidência de patógenos, responsáveis por disseminar doenças nos pomares citrícolas através de material propagativo infectado (NEVES et al., 2010) por diversas espécies fúngicas, destacando *Alternaria alternata* (Fr:Fr) Keissler f. sp. *citri*, agente causador da mancha marrom de alternaria (MMA) (SPÓSITO et al., 2003).

Essa doença pode afetar as mudas de tangerineira ‘Dancy’ apresentando sintomas como lesões de cloração marrons a preta em ramos, frutos e folhas, as quais se tornam circundadas por halos amarelos, que se expandem, formando áreas necrosadas circulares ou irregulares, envolvendo largas partes das folhas e como consequência a desfolhação, diminuindo a produtividade nos pomares comerciais (MILANEZE, 2013).

O controle da MMA requer uma ou mais táticas empregadas dentro do manejo integrado com métodos alternativos, utilizando extratos vegetais com potencial antimicrobiano no controle de doenças em citros, visando reduzir ou substituir a proteção convencional promovida pela aplicação de fungicidas, contribuindo para atender à crescente demanda nacional e

internacional por produtos agroecológicos e incrementando a produção (LOPES; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2009).

O pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* (Benth.) Ducke) é uma espécie que tem sido investigada a partir de métodos fitoquímicos e bioquímicos que privilegiam a prospecção de moléculas vegetais presentes em diferentes partes da planta (folhas, caule e frutos), uma vez que possuem reservas estocadas de proteínas, lipídeos, carboidratos e enzimas como a polifenoloxidase, peroxidase e a fenilalanina amônia-liase que podem estimular a produção de metabólitos secundários responsáveis pela formação de diferentes compostos fenólicos nas plantas e também podem atuar com ação fungitóxica sobre os patógenos com alto potencial no controle de doenças (STANGARLIN et al., 2011).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi determinar o potencial do extrato vegetal de pau ferro em respostas de defesa em mudas de tangerineira ‘Dancy’ no manejo da mancha marrom de alternaria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do Experimento

Foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais. O preparo do inóculo de *A. alternata* f. sp. *citri* e a diluição do extrato de *C. ferrea* foi realizada no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT), as análises das atividades enzimáticas das folhas de tangerineiras tipo ‘Dancy’ no Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), no Centro de Ciências Agrárias-UFPB Campus II, Areia-PB. O preparo do extrato de *C. ferrea* foi feito no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Campus I, João Pessoa-PB.

2.2 Aquisição das Mudas de Tangerineira ‘Dancy’

Quando os porta-enxertos de limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck) estavam com 180 dias e atingiram 20 cm de altura, foram transplantadas para sacos plásticos de polietileno preto com espessura de 10 x 15 cm, (capacidade 7 L), contendo areia esterilizada e substrato comercial Plantimax® na proporção 2:1, regadas duas vezes ao dia (início da manhã e no final da tarde) com ajuda de um regador manual (capacidade 20 L). O enxerto utilizado foi a tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka) e o método de enxertia foi do tipo borbulhia em ‘T’ invertido. E após 90 dias da enxertia, obtiveram-se a formação completa das mudas provenientes de produtor comercial na cidade de Remígio-PB (6° 54' 10" S, 35° 50' 2" W).

2.3 Preparo e Aplicação dos Tratamentos

As folhas de pau-ferro foram coletadas na Área Experimental da Chã de Jardim, pertencente ao CCA, Campus II, Areia-PB (6° 57' 42" Sul e 35° 41' 43" Oeste) e dispostas em sacos de papel, foram levadas à estufa com temperatura constante de 60 °C por um período de 72 h, até a obtenção da massa seca. Posteriormente, as folhas foram trituradas em moinho de facas para a obtenção do pó, em seguida pesadas 100 g e colocadas em recipientes de vidro à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) com adição de 200 mL de etanol (96%), agitadas duas vezes ao dia, por um período de 72 horas em infusão (LIMA et al., 2010).

Em seguida, filtrou-se o líquido e por meio de evaporador rotativo com temperatura de 40 °C foi removido o etanol, e desta forma foi obtido o extrato bruto etanólico (CARRERA et al., 2014). Posteriormente, foi feita a diluição do extrato em água destilada esterilizada (ADE) com ajuda de um agitador magnético, por um período de duas horas, para obtenção das seguintes concentrações: 0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL.

As mudas de tangerineira ‘Dancy’ foram pulverizadas com o extrato vegetal até ponto de escorrimento. Após a aplicação dos tratamentos, foram acondicionadas em câmara úmida com sacos de polietileno transparentes, vedados na extremidade e borrifados com água destilada, por um período de 24 horas, em temperatura ambiente (28 ± 2 °C).

2.4 Obtenção do Isolado e Inoculação de *A. alternata* f. sp. *citri* em Folhas de Tangerineira ‘Dancy’

O isolado de *A. alternata* foi obtido a partir de frutos cítricos com sintomas típicos da mancha marrom de alternaria, coletados em área produtora no município de Lagoa Seca-PB (7° 10' 15" S e 35° 51' 14" W). Os frutos foram desinfestados por meio de lavagens com etanol 70%, por 30 segundos, hipoclorito 1%, por três minutos e duas lavagens com água destilada esterilizada, retiraram-se três fragmentos de 5 mm e foram incubados em meio de cultura BDA (200 g batata, 20 g dextrose, 20 g ágar L⁻¹) à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) acrescido do fungicida Carbendazin (50 mL/100 L de água), para inibição da proliferação de fungos contaminantes no meio de cultura, durante sete dias (COLTURATO, 2006).

Para confirmar a identidade dos isolados, três discos com 5 mm de diâmetro, com colônias do fungo foram transferidos para o meio CaCO₃ (30 g de CaCO₃, 20 g de sacarose e 20 g de ágar L⁻¹), para indução de esporulação de *A. alternata* e mantidos em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) (CANIHOS; PEEVER; TIMMER, 1999).

Após sete dias de cultivo, foram realizadas análises macro e microscópicas. Observou-se a pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas *in vitro*, através de esfregaços em lâminas de microscopia, que foram coradas com azul de metileno. A identificação foi realizada observando-se estruturas como micélio e esporos (ROTEM, 1998).

Após aplicação dos tratamentos foram feitas lesões na face abaxial das folhas, com aproximadamente 1 mm de profundidade em quatro folhas por mudas, com o auxílio de um bisturi esterilizado e adicionada a suspensão de esporos (10⁵ esporos/mL) obtida através da adição de 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) nas placas contendo as colônias do fungo, cujos esporos foram raspados com o auxílio de uma espátula estéril, filtrados em dupla camada de gaze esterilizada e quantificados em hemocítômetro, para a diluição, acrescida de Tween[®] 20 (2 gotas/L).

Com auxílio de um borrifador manual, foi realizada a pulverização contendo a suspensão do inóculo de *A. alternata* (10⁵ esporos/mL) em folhas de tangerineiras ‘Dancy’ até atingir o ponto de escorrimento.

2.5 Avaliação da Incidência, Severidade e AACPD em Folhas de Tangerineira ‘Dancy’

Aos 23 dias após a inoculação, foi feita a avaliação da incidência (%), determinada através da percentagem de folhas com sintomas da mancha marrom de alternaria, de acordo com Sangoi et al. (2000), utilizando a seguinte fórmula: % Incidência = (Nº de folhas sintomáticas/ Nº total de folhas) x 100.

No quarto dia após a inoculação (DAI), foram realizadas diariamente as avaliações da severidade mediante emprego de escala diagramática estabelecida por Martelli (2011) (Figura 1), onde foram escolhidas da segunda à quinta folha de tangerineira completamente expandidas de cima para baixo e identificadas com ajuda de uma fita plástica colorida, envolvendo o pecíolo, de acordo com a metodologia descrita por Costa et al. (2009), até atingir a última escala de notas que se deu no vigésimo terceiro dia.

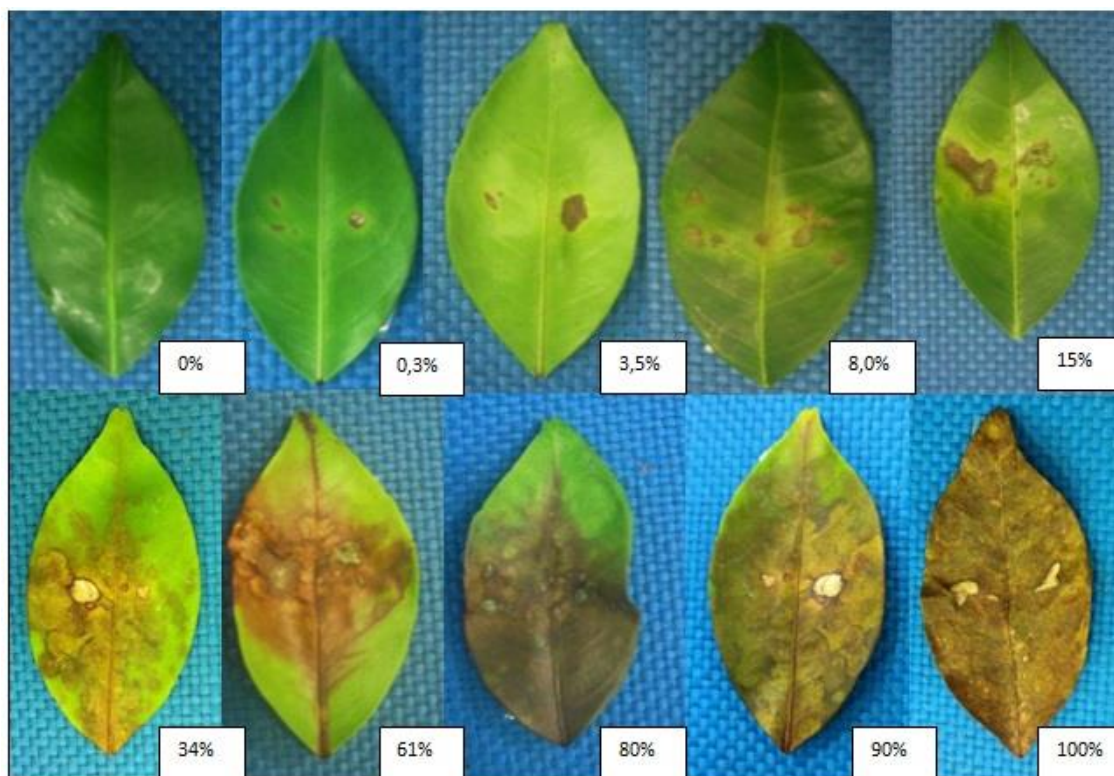


Figura 1. Escala diagramática descrita por Martelli (2011) utilizada para avaliação da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*). UFPB, Areia-PB, 2015.

Posteriormente, com os dados da severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), descrita por Shaner; Finney (1977), utilizando a seguinte fórmula: $\{S [(y_i + y_{i+1})/2] \cdot (t_{i+1} - t_i)\}$, onde y_i e y_{i+1} são as percentagens de área foliar lesionada observada nas avaliações e $t_{i+1} - t_i$ são os intervalos entre as avaliações. O ponto de

máxima eficiência técnica da incidência e severidade foram encontrados de acordo com Storck et al. (2011).

A proteção das mudas foi calculada através da AACPD de cada tratamento, em que a % Proteção = (AACPD Tratamentos x 100/AACPD Testemunha), descrita por Del Rovere (2013).

2.6 Avaliação da Atividade Enzimática

No primeiro e no vigésimo terceiro dia, foram retiradas três folhas por planta de cada repetição, totalizando 75 folhas, para a quantificação das proteínas, macerando-se 0,02 g de folhas em almofariz com 4,0 mL de tampão de acetato de sódio (50 mM), (pH 5,2). A mistura foi filtrada em tecido de trama fina e a suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante coletado de cada amostra foi transferido para microtubos de 2 mL e mantido a -80 °C até o momento das análises.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. E o ponto de máxima eficiência técnica das atividades enzimáticas foram encontradas de acordo com Storck et al. (2011).

2.6.1 Proteínas Totais

As proteínas solúveis contidas nos extratos foram aferidas pelo ensaio de Bradford (1976), através da curva padrão, onde foi adicionada 100 µL de uma solução de BSA (µg/µL). A partir dessa solução, foram feitas as diluições seriadas em água ADE para a obtenção das demais concentrações (0 µg/µL; 2 µg/µL; 4 µg/µL; 6 µg/µL; 8 µg/µL; 10 µg/µL). Em seguida, a preparação do branco, através da adição em um tubo de microcentrífuga 50 µL água ADE e 100 µL de Bradford. E para o preparo da amostra, foi adicionando em um tubo de microcentrífuga 50 µL do extrato e 1000 µL de Bradford.

As reações preparadas anteriormente, foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida, foi medida a absorbância em comprimento de onda 595 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína.

2.6.2 Atividade da Fenilalanina Amônia-liase (FAL)

Determinada pela quantificação do ácido trans-cinâmico liberado a partir da fenilalanina (UMESHA, 2006). Para isso, foi adicionado 250 µL de extrato, 1500 µL de tampão Tris-HCl (100 mM) (pH 8,8), 500 µL de fenilalanina (100 mM) e 750 µL de ADE, incubado a 40 °C por 60 minutos. Logo após, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido clorídrico (5,0 M).

A leitura foi realizada em cubeta de quartzo no espectrofotômetro (Lightwave II, WPA, Biochron) por meio de variação na absorbância em comprimento de onda 290 nm e expressa em U.A /min./mg de proteína.

2.6.3 Atividade da Peroxidase (POD)

Foi determinada a partir da reação que consistiu na adição de 750 µL do tampão de reação com tampão fosfato de sódio (100 mM) (pH 6,0), 250 µL de guaiacol (1,7%), 250 µL (H₂O₂) e 250 µL composto por: 150 µL de água + 100 µL do extrato, onde o guaiacol peroxidase converteu o guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi paralisada com a adição de 800 µL de ácido perclórico (2,0 M) e monitorada a por um período de dois min e, a cada 15 segundos foram realizadas leituras para verificar a atividade da enzima peroxidase com comprimento de onda de 470 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína (RONCATO; PASCHOLATI, 1998).

2.6.4 Atividade da Polifenoloxidase (PPO)

Foi realizada através da conversão de catecol em quinona, com adição de 250 µL de catecol (60 mM), 750 µL do tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) e 250 µL de extrato. As amostras foram aquecidas em banho Maria a 40 °C durante 15 minutos, seguido de esfriamento. Logo após, a reação foi paralisada com a adição de 800 µL de ácido perclórico (2,0 M), com a medida de absorbância registrada a 395 nm. Os resultados foram expressos em U.A/min./mg de proteína (DUANGMAL, APENTEN, 1999).

2.7 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*) e 25 repetições por tratamento, formando a unidade experimental com 125 mudas. Foi realizada análise de regressão para as concentrações do extrato de *C. ferrea*, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$) no programa SAS[®] System 9.3 (SAS Institute, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da Incidência

Avaliando a incidência de *A. alternata* em folhas de tangerineira ‘Dancy’, observou-se efeito quadrático, verificando que as concentrações 0 e 10 µg/mL do extrato de *C. ferrea* apresentaram as maiores taxas de incidência. A partir da concentração de 100 µg/mL, ocorreu a redução da incidência, atingindo o ponto de mínimo em 480 µg/mL, até a concentração de 500 µg/mL, foram responsáveis por promoverem as menores taxas de incidência e reduções que variaram de 62,5 a 58,33% respectivamente. Na concentração de 1000 µg/mL verificou-se o aumento na taxa de incidência, superando os demais tratamentos (Figura 2).

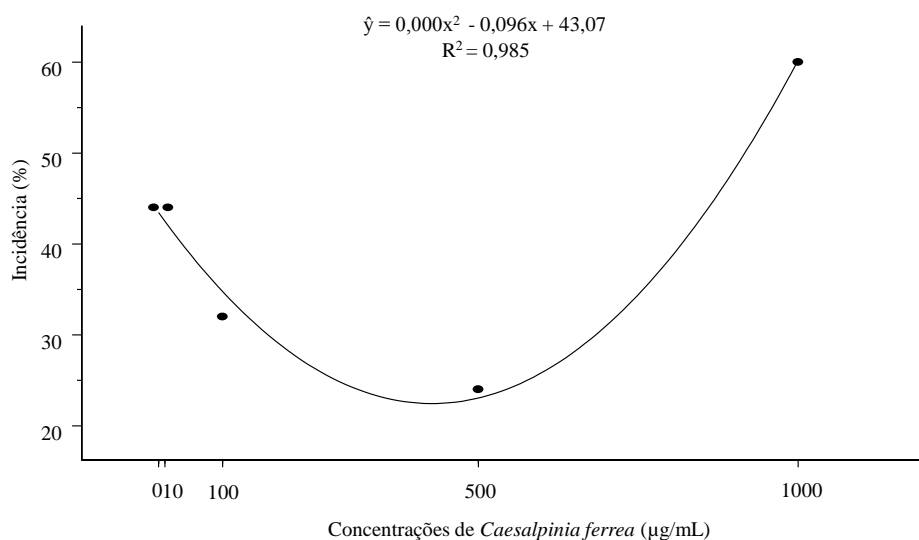


Figura 2. Incidência de Mancha Marrom de *Alternaria* em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculadas com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

3.6 Avaliação da Severidade

Ao avaliar a severidade da MMA em folhas de tangerineira ‘Dancy’ observou-se também efeito quadrático, as folhas não tratadas e a maior concentração do extrato de *C. ferrea* apresentaram as maiores percentagens e à medida que se aumentaram as concentrações, verificaram-se reduções nas áreas, apresentando as menores percentagens de área foliar lesionada 3,5% a partir da concentração de 100 µg/mL, atingindo o ponto de mínimo em 490 µg/mL até a concentração 500 µg/mL (Figura 3).

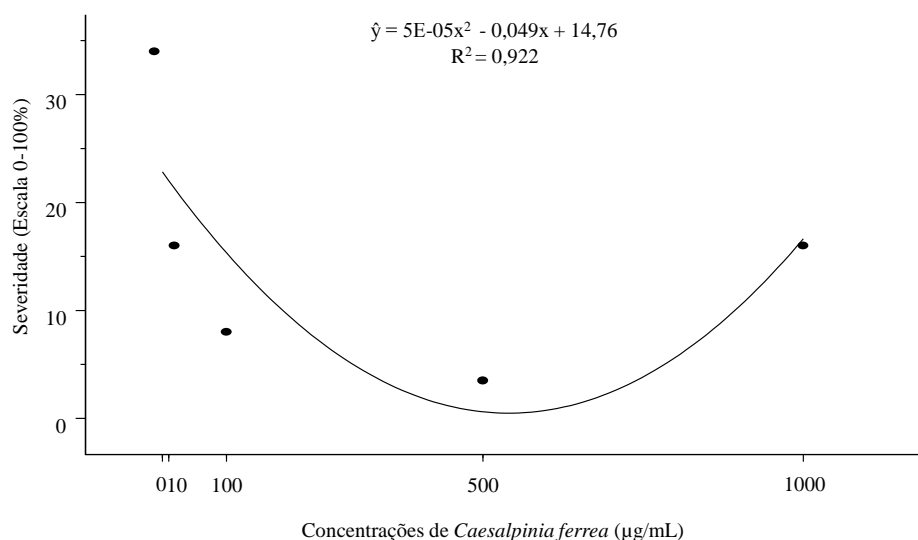


Figura 3. Escala diagramática da severidade em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*), inoculadas com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL), em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

A redução da incidência e severidade sobre a mancha marrom de alternaria como mostram as (Figuras 2 e 3) em frutos de tangerineira ‘Dancy’ ocorreram nas concentrações 100 e 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea*. Tal fato pode ter ocorrido, de acordo com Bezerra et al. (2011) o modo de ação dos compostos biologicamente ativos, como as saponinas, flavonóides e os taninos podem ter influência sobre no controle da doença, visto que, as concentrações medianas do extrato de *C. ferrea* foram responsáveis pela atividade fungitóxica, pois promoveram o controle da mancha marrom de alternaria.

As afirmações acima podem ser comprovadas por Rabea et al. (2009) quando observaram que os compostos bioativos estimularam os mecanismos de ação sobre diversas doenças, interferindo no metabolismo e crescimento do patógeno através de mudanças morfológicas, alterações estruturais e desorganizações molecular e consequentemente responsáveis pela redução da severidade.

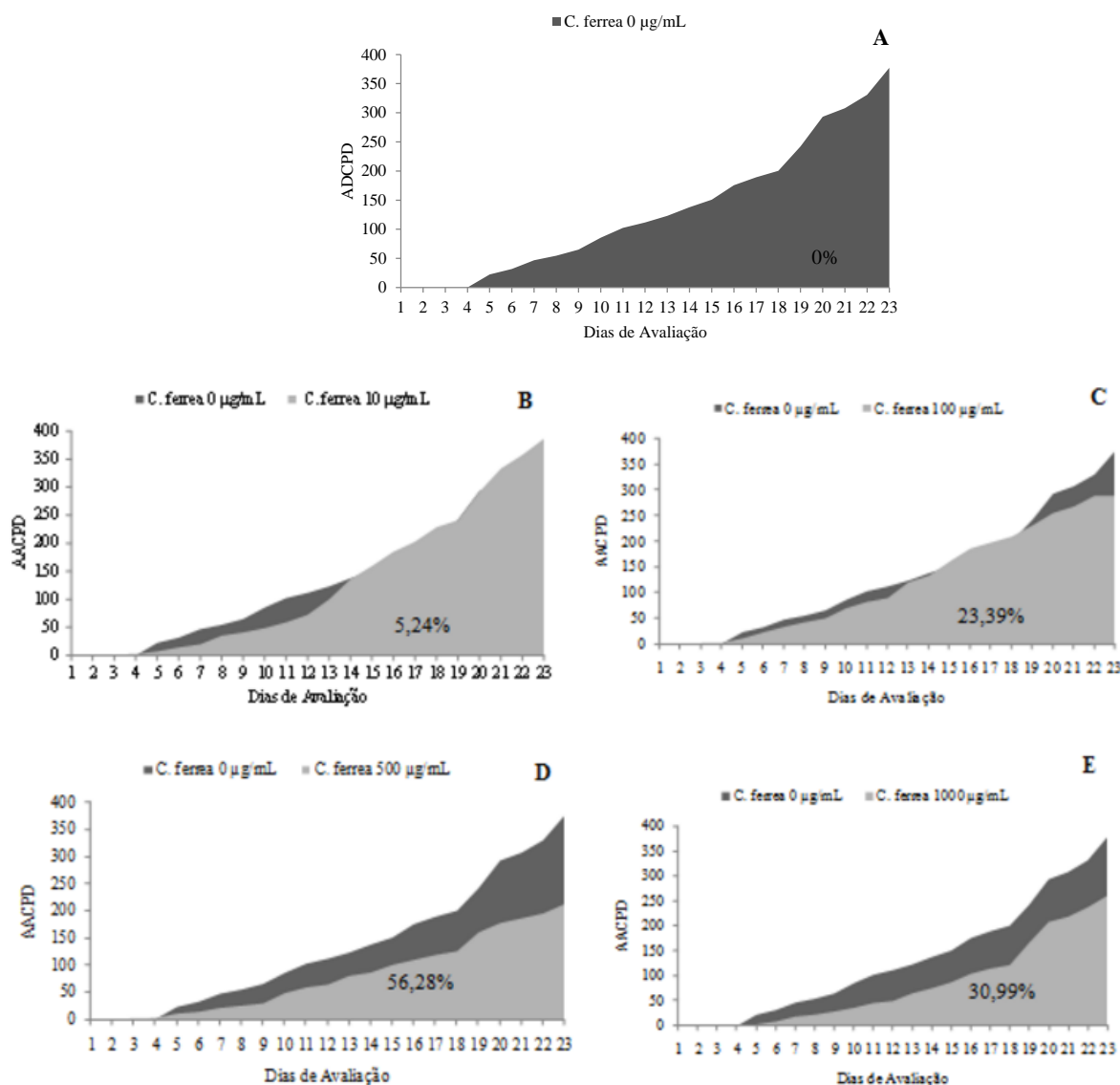
As baixas concentrações do extrato de *C. ferrea* apresentadas nas Figuras 2 e 3 não apresentaram mecanismos eficientes sobre o patógeno, tal fato pode ter ocorrido devido à volatilização pela complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade desses íons. Segundo Loquercio et al. (2005) as pequenas quantidades de compostos secundários, não foram capazes de afetar a membrana celular do patógeno e nem interferir nas suas atividades metabólicas.

A alta concentração do extrato de acordo com as não apresentaram eficiência sobre a mancha marrom de alternaria, provavelmente devido à possível inibição da atividade de algumas enzimas, bem como o funcionamento de vitaminas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992) ou à volatilização de diversos compostos secundários responsáveis pela ativação de reações químicas do metabolismo secundário (SILVA; SANTOS; GOMES, 2014).

Moura; Silva Filho; Corrêa (2013) utilizando os extratos de folhas de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) e goiabeira (*Psidium guajava* L.) verificaram que a concentração mediana 20% dos respectivos extratos foram responsáveis por reduzir a severidade da MMA em torno de 80 e 83,9% em frutos de tangerineira ‘Dancy’. Borges et al. (2013) avaliando o potencial do extrato de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* L.) no controle da mancha de alternaria ((*Alternaria cucumerina* (Ell&Ev.) Ellio)) em mudas de melanciaira (*Citrullus lanatus* L.) constataram redução da severidade de até 63% na concentração de 4,5 mg/mL, mostrando-se eficiente no controle da doença.

3.3 Avaliação da AACPD

Utilizando o extrato de *C. ferrea* em folhas de tangerineira ‘Dancy’ na concentração 10 µg/mL verificou-se a menor percentagem de proteção 5,24 e consequentemente ocorreu aumento na área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). Já nas concentrações 100; 500 e 1000 µg/mL obtiveram as maiores percentagens de proteções e 23,39%; 56,28 e 30,99% e menores AACPD para a mancha marrom de alternaria (MMA) quando comparados com a testemunha até o vigésimo terceiro dia de avaliação (Figuras 4A, B, C, D e E).



Figuras 4. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de tangerineira 'Dancy' (*Citrus tangerina*) inoculadas com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações: (A) 0; (B) 10; (C) 100; (D) 500 e (E) 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

A redução da taxa da AACPD sobre a mancha marrom de alternaria em folhas de tangerineira 'Dancy' ocorreram nas maiores concentrações de *C. ferrea* como mostram as Figuras 4C, D e E. Tal fato pode ser explicado devido à eficiência do método de extração com os solventes a base de etanol (PESCHEL et al., 2006), o que pode ter influenciado na maior extração dos compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Observa-se que a partir de 23,39% de proteção para a MMA em folhas de tangerineira 'Dancy' resultaram nas menores áreas lesionadas. Este comportamento pode ser melhor visualizado nos resultados de AACPD (Figuras 4, C, D e E), onde verifica-se que os melhores desempenhos ocorreram nas concentrações 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *C. ferrea* quando

comparou-se com as demais concentrações, podendo ser recomendando para o controle preventivo da mancha marrom de alternaria.

Além da extração dos compostos e as quantidades presentes nos extratos como os ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, ligninas, taninos condensados e hidrolisáveis (NACZK; SHAHIDI, 2004) e o ácido gálico que são substâncias tóxicas (BEZERRA et al., 2011) podem ter influenciado na atividade antifúngica *in vitro* na concentração de 5,1 µL/mL do extrato etanólico de pau-ferro, sendo responsável pela inibição do crescimento de *A. alternata*.

A baixa concentração do extrato de *C. ferrea* não promoveu eficiência no controle da mancha marrom (Figura 4B), provavelmente devido ao acúmulo dos compostos fungitóxicos, impedido a eficiência da ação direta sobre o patógeno e influenciado nas menores percentagens de proteções em folhas de tangerineira ‘Dancy’.

Filipini; Di Piero (2009) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de Qitosana® (2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/mL) sobre a podridão amarga da macieira (*Malus domestica* (Borkh) causada por *Colletotrichum acutatum* (J.H. Simmonds) e verificaram redução da AACPD a medida que aumentavam as concentrações.

3.4 Atividades da Fenilalanina amônia-liase (FAL), Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO)

Analisando a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de tangerineira ‘Dancy’, verificou-se que com o aumento das concentrações do extrato de *C. ferrea* 10 e 100 µg/mL ocorreram o aumento da atividade da enzima de 3,8 a 5,0 U.A mg/proteína/min, atingindo o ponto de mínimo na concentração 500 µg/mL, com atividade 0,7 U.A mg/proteína/min. E na concentração 1000 µg/mL, verificou-se a maior atividade desta enzima 9,3 U.A mg/proteína/min (Figura 5).

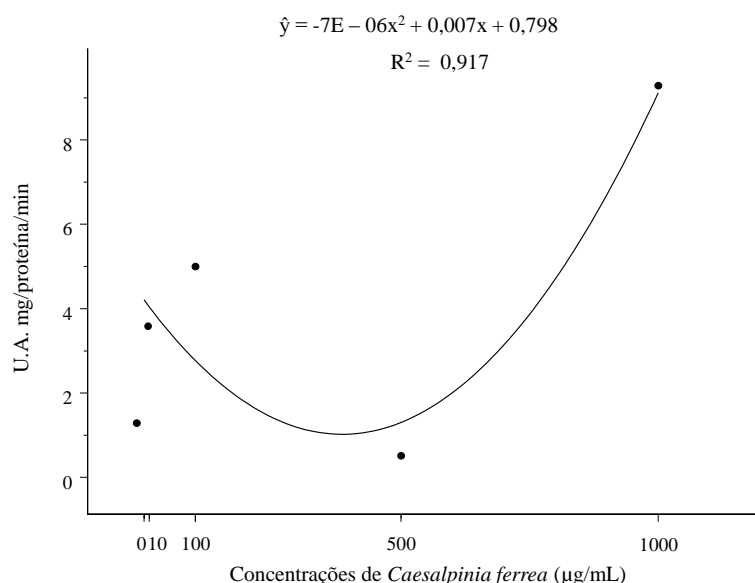


Figura 5. Atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina*) inoculadas com *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (10^5 esporos/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* e testemunha. UFPB, Areia-PB, 2015. Diferença significativa em relação a testemunha pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Verificou-se no presente trabalho que a maior atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ ocorreu na maior concentração do extrato de *C. ferrea* (Figura 5) e apresentaram as maiores incidência do patógeno (Figura 2), severidade (Figura 3) e as maiores percentagens de área foliar lesionadas (Figura 4E). Tal fato pode ser explicado por Melo (2014) quando afirmaram que as plantas que recebem estímulo relacionado ao estresse, apresentam alta atividade enzimática, em relação aquelas que não receberam.

Segundo Chakraborty; Dutta; Chakraborty, (2001) a atividade da fenilalanina amônia-liase aumenta em resposta a diferentes tipos de estresse, sendo considerada por muitos autores como ‘proteína do estresse’ e também pode estar relacionada a adaptação das plantas a situações adversas.

Verificou-se que a partir da concentração 100 µg/mL do extrato de *C. ferrea*, ocorreu o aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) (Figura 5), promovendo uma maior proteção a planta contra a mancha marrom de alternaria.

Esse fato pode ser explicado por Almeida et al. (2012) quando afirmaram que a fenilalanina amônia-liase é uma das enzimas-chave na rota dos fenilpropanóides, responsável pela desaminação da L-fenilalanina com consequente formação do ácido trans-cinâmico, e quando estimuladas, induz a expressão constitutiva de metabólitos secundários de origem

fenólica no qual é incorporado diferentes compostos fenólicos que são substâncias tóxicas produzidas constitutivamente nas plantas em resposta ao ataque de patógenos, além de estimular a lignificação na parede celular (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

Quando utilizaram-se todas as concentrações do extrato de *C. ferrea* e comparou-se com a testemunha, não observou-se diferença estatística para as atividades enzimáticas da peroxidase e polifenoloxidase em folhas de tangerineira ‘Dancy’, verificando-se alta atividade da peroxidase (POD) 120,58; 262,16; 153,00; 120,47 e 116,94 U.A mg/proteína/min e também da polifenoloxidase (PPO) 1,31; 0,83; 0,19; 0,82 e 1,16 U.A mg/proteína/min, respectivamente.

Portanto, independente das concentrações do extrato de *C. ferrea* utilizadas no presente trabalho, verificou-se que ocorreram altas atividades enzimáticas da peroxidase e polifenoloxidase em folhas de tangerineiras ‘Dancy’, o que fomenta a discussão quanto ao papel da expressão das atividades destas enzimas, de acordo com Moerschbacher (1992) podem estar relacionadas a diversas funções fisiológicas realizadas pelas plantas, como o estresse que pode estar associados a biossíntese de lignina que atuam nas células vizinhas às infectadas e aos ferimentos as quais direcionam um sistema de defesa à área do ferimento provocados por patógenos (BINDSCHEDLER et al., 2002; CAMPOS et al., 2004). Como também as diversas substâncias tóxicas presente no extrato de *C. ferrea* como as saponinas, flavonóides e os taninos (BEZERRA et al., 2011) que podem atuar com ação direta sobre o patógeno.

Ainda de acordo com Schallenberger (2005) e Lokhande et al. (2010) estas enzimas podem atuar como a reguladores do alongamento celular, ligação entre os polissacarídeos da parede celular, produção de suberinas, lignificação de tecidos, indução no florescimento, dentre outros. Como também a atividade da polifenoloxidase pode estar relacionada à construção da parede celular, formação de complexos protéicos e o controle dos níveis de oxigênio dentro dos cloroplastos (ALVARENGA et al., 2013).

Sarria Villa (2010) avaliando a atividade da peroxidase em folhas de tangerineira ‘Sunki’ (*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka), mediante o uso de elicitores no controle da *Phytophthora citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) verificou que ocorreu a atividade desta enzima, porém, não houve alteração na atividade nos tratamentos analisados.

4 CONCLUSÕES

- ✓ As concentrações 100 e 500 µg/mL do extrato de *C. ferrea* reduziram a incidência de *A. alternata* e a severidade da mancha marrom de alternaria (MMA), apresentaram baixa atividade da enzima fenil alanina amônia-liase, porém, promoveram altas atividades das peroxidase e polifenoloxidase em folhas de tangerineira ‘Dancy’.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H.O.; BARBOSA, M.O.; MARQUES, A.R.; T.H.A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M.J.; TESSAROLLO, N.G.; GAMES, P.D.; BARROS, E.G.; MOREIRA, R.S.; GUIMARÃES, F.C.M.; ABDELNOOR, R.F.; PEREIRA, P.R.G.; PEREIRA, M.C.B. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.47, n.2, p.163-172. 2012.
- ALVARENGA, M.A.R.; MELO, P.C.T.; SHIRAHIGE, F.H. Cultivares In: Alvarenga, M.A.R. **Produção em campo, casa de vegetação e hidroponia**. 2ª Ed. Lavras. Editora Universitária de Lavras-MG, 2013. p.49- 59.
- BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M.; PEREIRA, A.V.; SOUSA, E.O.; RODRIGUES, O.G. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum**, Maringá-PR, v.33, n.1, p.99-106, 2011.
- BINDSCHEDLER, L.F.; BLEE, K.A.; BUTT, V.S.; DAVIES, D.R.; GARDNER, S.L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three components system. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1357-1376, 2002.
- BORGES, I.V.; PEIXOTO, A.R.; CAVALCANTI, L.S.; LIMA, M.A.G.; SILVA, M.S. Extratos de jurema preta no controle de mancha-de-alternaria em melancia. **Revista Caatinga**, Mossoró-RN, v.26, n.3, p.36-45, 2013.
- BRADFORD, M.M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P. da; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.39, p.637-643, 2004.

CANIHOS, Y.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of Minneola Tangelo leaves by *Alternaria* sp. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, p.429-433, 1999.

CARRERA, G.C.; BENEDITO, E.F.; SOUZA-LEAL, T.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; GASPI, F.O.G. Testes físico-químicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas-SP, v.16, n.4, p.938-944, 2014.

CHAKRABORTY, U.; DUTTA, S.; CHAKRABORTY, B. Droughth induced biochemical changes in Young tea leaves. **Indian Journal of Plant Physiology**, India, n.6, p-103-106, 2001.

COLTURATO, A.B. **Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, causador da mancha marrom do tangor murcote**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências agrônômicas, São Paulo-SP. 2006.

COSTA, A.C.T. da; OLIVEIRA, L.B. de; CARMO, M.G.F. do; PIMENTEL, C. Avaliação visual e do potencial fotossintético para quantificação da ferrugem do milho pérola e correlações com a produção. **Tropical Plant Pathology**, Brasília- DF, v.34, n.5, p.313-321, 2009.

DEL ROVERE, N.S. **Programas de pulverização com fungicidas sistêmicos e cúpricos em diferentes combinações no controle da mancha preta dos citros**. 2013. 42f. Dissertação (Mestrado). Fundo de Defesa da Citricultura, São Paulo-SP. 2013.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, p.351-359, 1999.

FILIPINI, R.B.; DI PIERO, R.M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v.44, n.12, p.1591-1597, 2009.

IBGE - **Instituto brasileiro de geografia e estatística: Comentários**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2011/pam2011_comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2011/pam2011_comentarios.pdf)>. Acesso em: 13 Jan. 2015.

LIMA, J. de S.; PEREZ, J.O.; BARROS, P.N.; AZEVEDO, L.C.; MENDES, R.B.; PESSOA, R.A. Atividade fungitóxica de extratos vegetais de plantas da caatinga sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Vitis vinifera*. L. V **CONNEPI**, Maceió-AL, 2010.

LOKHANDE, V.H; SRIVASTAVA, A.K.; SRIVASTAVA, S.; NIKAM, T.D.; SUPRASANNA, P. Regulated alterations in redox and energetic status are the key mediators of salinity tolerance in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* (L.). **The Journal of Plant Growth Regulation**, Austrália, n.10, 3p. 2010.

LOPES, E.B.; ALBUQUERQUE, I.C.; ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de-alternaria: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa-PB, v.3, n.3, p.23-27, 2009.

LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A.C. Atividade antimicrobiana de extrato hidro-alcoólico das folhas de Jambolão (*Zyzygium cumini*) L. Skells. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.35, n.2, p.317-76, 2005.

MARTELLI, I.B. **Manejo da mancha marrom de alternária em citros: poda de limpeza e correlação com a lagarta minadora**. 2011. 41f. Dissertação (Mestrado). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP. 2011.

MELO, A. de P. **Avaliação da tolerância à seca em feijoeiro inoculado com rizóbio e bactérias diazotróficas endofíticas na presença de ácidos húmicos**. 2014. 70f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Rio de Janeiro-RJ. 2014.

MILANEZE, T.F. **Poda e calda sulfocálcica para o controle da mancha marrom de alternária em tangor murcott**. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP. 2013.

MOERSCHBACHER, B.M. Plant peroxidases: involvement in response to pathogens, In C. Penel, T. Gaspar, H. Greppin, eds, **Plant Peroxidases, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects**. Universite de Geneve, Switzerland, 1992. p.91–99.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas-SP, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

MORALES, R.G.F.; SANTOS, I. dos; TOMAZELI, V.N. Influência da nutrição mineral foliar sobre doenças da parte aérea da cultura do trigo. **Revista Ceres**, Viçosa-MG, v.59, n.1, p.71-76, 2012.

MOURA, Á.Q.; SILVA FILHO, A.M.; CORRÊA, É.B. Extrato de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) para o controle da mancha de alternaria em tangerina. **VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia**, 5p. 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, New York, n.1-2, p.95-111, 2004.

NEVES, M.F.; TROMBIN, G.V.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138p.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.369-380, 1992.

PESCHEL, W.; SANCHEZ-RABANEDA, F.; D.N., W. PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMENEZ, D.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; BUXADERAS, S.; CONDINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, London, v.97, p.137-150, 2006.

RABEA, E.I.; BADAWY M.E.I.; STEURBAUT W.; STEVENS C.V. *In vitro* assessment of N-(benzyl) chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. **European Polymer Journal**, Enschede, v.45, p.237-245, 2009.

RONCATO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com leveduras (*Sccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agrícola**, São Paulo-SP, v.55, n.3, p.395-402, 1998.

ROTEM, J. **The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and patogenicity**. St Paul. APS Press. 1994. 26p.

SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A.F.; BOGO, A.; KOTHE, D.M. Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados com diferentes densidades de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.30, n.1, p.17-21, 2000.

SARRIA VILLA, G.A. **Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotianae*: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos fisiológicos e bioquímicos**. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado). ESALQ. São Paulo-SP. 2010.

SAS Institute. 2011. **SAS/STAT®** Versão 9.3: User's guide. SAS Institute Inc., 2011. 8621p.

SCHALLENBERGER, E. **Produção orgânica de tomate em diferentes ambientes de cultivo**. 2005. 128f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Rio Grande do Sul-RS. 2005.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow mild wing in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.1051-1055, 1977.

SILVA, G.C.; SANTOS, C.C.; GOMES, D.P. Incidência de fungos e germinação de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp) tratadas com óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas-SP, v.16, n.4, p.850-855, 2014.

SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M.S.A. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v.28, p.231, 2003.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel-PR, v.10, n.1, p.18-46. 2011.

STORCK, L.; GARCIA, D.C.; LOPES, S.J.; ESTEFANEL, V. **Experimentação vegetal**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 200p.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Best Dagan, v.34, n.1, p.68-71, 2006.